

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR  
ANNIE LÉGARÉ**

**CHANGEMENT DES PROPRIÉTÉS DES RÉCEPTEURS HÉPATIQUES DU  
GLUCAGON INDUIT PAR L'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE**

**AOÛT 2001**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce projet de maîtrise. En particulier, je voudrais remercier ma directrice de recherche, le Dr Carole Lavoie, pour son support, sa disponibilité et sa passion pour la recherche. Quelle belle transmission du savoir et de la passion!

Je tiens aussi à remercier mon codirecteur, le Dr Guy Massicotte, pour ses précieux conseils lors de la mise au point des techniques. Ces petites bouées de sauvetage m'ont permis d'arriver à bon port.

Un merci tout spécial à Mme Rollande Caron, responsable de l'animalerie, pour son aide, son souci du bien-être des animaux et l'attention particulière qu'elle porte aux étudiants. Comment ne pas souligner une personnalité aussi généreuse et chaleureuse !

Je tiens aussi à remercier Mme Christine Gauthier pour le temps précieux consacré à la correction de ce mémoire.

Je voudrais également témoigner ma reconnaissance à M. Alain Maire, doyen des études de cycles supérieurs et de la recherche, pour son aide et soutien à la réalisation et à la publication de ce travail. Je tiens aussi à mentionner l'apport des organismes qui ont

subventionné ce travail : Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la recherche (équipe de recherche et nouveau chercheur) et l'association diabète québec.

Finalement, un grand merci à mes collègues de laboratoire, Réjean, Martin, Geneviève et Valérie. En particulier à Martin, professionnel de recherche, et Réjean, étudiant au doctorat, pour leur aide, leur soutien et les discussions que nous avons eues tout au long de la maîtrise. À Geneviève et à Valérie, merci pour l'apport féminin au laboratoire et pour les discussions.

Un projet de maîtrise ne se réalise jamais seul. Sans les appuis que vous m'avez témoignés, le chemin parcouru n'aurait pas été aussi enrichissant et aussi agréable.

À tous, recevez l'expression de ma gratitude la plus sincère.

*Annie Légaré*

## RÉSUMÉ

Il a été récemment démontré que l'entraînement en endurance induisait une augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon chez des sujets sains (Drouin R et col. *Am. J. Physiol.*, 1998, 274, E23-E28). Néanmoins, les mécanismes responsables de ce changement demeurent encore non définis. L'objectif de la présente étude était de caractériser l'impact d'un entraînement en endurance sur les propriétés des récepteurs hépatiques au glucagon. Spécifiquement, nous avons mesuré l'affinité ( $K_D$ ) et la densité ( $B_{max}$ ) des récepteurs hépatiques au glucagon, suite à un programme d'entraînement en endurance chez des animaux sains.

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été aléatoirement assignés à un groupe sédentaire (S,  $n = 6$ ) et entraîné (E,  $n = 7$ ). L'entraînement en endurance consistait en 8 semaines de nage (3h/j, 5j/sem). L'activité de la citrate synthétase était significativement augmentée de 30% dans le rectus fémoral des rats entraînés. 48 heures post-exercice, les membranes plasmiques de foie des rats sédentaires et entraînés ont été purifiées par un système de partition par affinité en deux phases aqueuses. Les membranes plasmiques ont été incubées (30 min, 30°C) en présence d'une concentration croissante d' $[^{125}I]$ -glucagon (0,15-2,4 nM).

L'entraînement en endurance chez les animaux sains augmente significativement de 28% le  $B_{max}$  des récepteurs au glucagon (S :  $3,09 \pm 0,12$  vs E :  $4,28 \pm 0,19$  pmol/mg de protéines,  $P < 0,001$ ), sans toutefois modifier le  $K_d$  (S :  $0,57 \pm 0,06$  vs E :  $0,77 \pm 0,09$  nM,  $P > 0,1$ ).

protéines,  $P < 0,001$ ), sans toutefois modifier le  $K_d$  (S :  $0,57 \pm 0,06$  vs E :  $0,77 \pm 0,09$  nM,  $P > 0,1$ ).

En conclusion, ces résultats indiquent que les changements de la sensibilité hépatique au glucagon induits par l'entraînement en endurance peuvent s'expliquer, en partie, par des modifications de la densité des récepteurs du glucagon.

## TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	i
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES .....	viii
<b>CHAPITRE 1</b>	
INTRODUCTION.....	1
<i>1 Régulation de la glycémie au repos .....</i>	<i>1</i>
<i>1.1 Rôle du glucose.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Importance de l'homéostasie.....</i>	<i>2</i>
<i>1.2.1 Rôle du foie dans l'homéostasie du glucose.....</i>	<i>2</i>
<i>1.2.2 Régulation hormonale .....</i>	<i>3</i>
<i>2 Régulation de la glycémie à l'exercice.....</i>	<i>4</i>
<i>2.1 Rôle du foie.....</i>	<i>4</i>
<i>2.2 Régulation hormonale .....</i>	<i>5</i>
<i>2.3 Hormones contre-régulatrices.....</i>	<i>7</i>
<i>3 Effet de l'entraînement en endurance sur la régulation hormonale .....</i>	<i>8</i>
<i>3.1 Étude de Drouin et collaborateurs .....</i>	<i>9</i>
<i>3.2 Étude de Nieto et collaborateurs.....</i>	<i>10</i>
<i>4 Récepteurs du glucagon .....</i>	<i>13</i>
<i>4.1 Caractérisation des récepteurs du glucagon.....</i>	<i>21</i>



4.2 Régulation du récepteur du glucagon.....	22
4.3 Entraînement en endurance et régulation des récepteurs .....	26
5 Problématique .....	30
BIBLIOGRAPHIE .....	31
<b>CHAPITRE 2</b>	
Augmentation de la densité des récepteurs hépatiques du glucagon chez les rats entraînés en endurance.....	44
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	45
ABSTRACT.....	47
Introduction.....	48
METHODS .....	49
ANIMALS AND TRAINING .....	49
Tissue sampling and plasma membrane purification.....	49
Binding assay .....	51
Analysis .....	52
Statistics .....	52
RESULTS.....	53
DISCUSSION .....	54
ACKNOWLEDGEMENTS.....	57
REFERENCES.....	58

**CHAPITRE 3**

DISCUSSION .....	69
3.1 <i>Techniques employées</i> .....	69
3.2 <i>Résultats</i> .....	73
3.3 <i>Études antérieures</i> .....	73
3.4 <i>Régulateurs potentiels</i> .....	74
3.5 <i>Perspectives de recherche</i> .....	78
3.6 <i>Conclusion</i> .....	80
BIBLIOGRAPHIE .....	81
ANNEXE.....	85
Lettre d'acceptation de publication .....	86

## LISTE DES FIGURES

Figure	page
1a: Effet d'une période d'exercice d'intensité modérée de 60 min sur la concentration plasmatique d'insuline .....	6
1b: Effet d'une période d'exercice d'intensité modérée de 60 min sur la concentration plasmatique de glucagon. ....	6
2a: Effet de l'entraînement en endurance sur la concentration plasmatique d'insuline lors d'une activité physique d'intensité modérée. ....	12
2b: Effet de l'entraînement en endurance sur la concentration plasmatique de glucagon lors d'une activité physique d'intensité modérée. ....	12
3: Schéma simplifié du cycle de régulation de la protéine G <sub>s</sub> .....	16
4: Représentation schématique de la sous-division de la superfamille des récepteurs liés aux protéines G. ....	17
5: Disposition schématique des segments d'une chaîne de récepteur lié à une protéine G. ....	18
6: Fixation du glucagon à son récepteur.....	19
7: Courbe de saturation des récepteurs hépatiques du glucagon. Incubation des membranes plasmiques purifiées des rats sédentaires (untrained) (n = 6) et entraînés (trained) (n = 7) en présence d'une concentration croissante de [ <sup>125</sup> I]-glucagon (moyenne ± erreur spécifique). ....	67

## LISTE DES FIGURES (suite)

Figure	page
8: Représentation graphique de type Scatchard de la liaison du [ $^{125}$ I]-glucagon aux membranes plasmiques purifiées des foies de rats sédentaires (untrained) (n = 6) et entraînés (trained) (n = 7) (moyenne $\pm$ erreur spécifique). .....	67
9: Épreuve fonctionnelle de liaison du I $^{125}$ -glucagon [0,15 nM] en fonction de la concentration de protéines de membranes plasmiques hépatiques. ....	71

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	page
1: Propriétés des protéines G liées à des récepteurs à sept domaines transmembranaires.....	20
2: Effet des différents régulateurs identifiés sur les récepteurs du glucagon. ....	24
3: Effet de l'entraînement en endurance sur différents récepteurs .....	28
4: Activité de la citrate synthétase, concentration plasmatique d'insuline et de glucagon, et propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon des animaux sédentaires (n = 6) et entraînés (n = 7). ....	66
5: Épreuve fonctionnelle de liaison du I <sup>125</sup> -glucagon (0,15 nM) avec des membranes plasmiques hépatiques en fonction du temps d'incubation.....	72
6: Épreuve fonctionnelle de liaison du I <sup>125</sup> -glucagon (0,15 nM) en fonction de la concentration en µg de protéines de membranes plasmiques hépatiques.....	72

**LISTE DES SYMBOLES ET DES ABBRÉVIATIONS**

AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
ATP	:	Adénosine 5'-triphosphate
BHK	:	Baby hamster kidney
B <sub>max</sub>	:	Densité
CS	:	Citrate synthétase
DAG	:	1,2-diacylglycérol
GDP	:	Guanosine 5'-diphosphate
GTP	:	Guanosine 5'-triphosphate
PIP <sub>2</sub>	:	Phosphatidyl 4,5-inositol
IBMX	:	Inhibiteur de l'activité de la phosphodiesterase
IP <sub>3</sub>	:	Inositol 1,4,5-triphosphate
K <sub>D</sub>	:	Affinité
O <sub>2</sub>	:	Oxygène
Pi	:	Phosphate inorganique
RE	:	Réticulum endoplasmique
$\dot{V}O_2$ max	:	Consommation maximale d'oxygène

## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION**

#### **1 Régulation de la glycémie au repos**

##### **1.1 Rôle du glucose**

Le glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) est un monosaccharide composé de six carbones, faisant partie des aldohexoses. L'utilisation du glucose dans les cellules fournit l'énergie nécessaire aux différents processus physiologiques. Le glucose est le seul substrat énergétique utilisé par les érythrocytes (Siems et col. 2000) et par les cellules du système nerveux (Levin et col. 1999) lors de conditions physiologiques normales. De plus, il représente une source importante d'énergie disponible pour les cellules musculaires lors d'activités physiques (Kjaer et col. 1991 ; Hultman 1995). Le glucose est donc une source d'énergie indispensable pour plusieurs tissus et organes, et implique que sa plasmatique doit être étroitement contrôlée.

## **1.2 Importance de l'homéostasie**

Le maintien de l'homéostasie glucidique requiert un contrôle strict entre l'apport exogène, la production endogène et l'utilisation du glucose. La concentration plasmatique de glucose est maintenue normalement à  $\sim 5$  mM. Suite à l'ingestion d'un repas, elle peut atteindre jusqu'à  $\sim 9$  mM. Dans des conditions pathologiques, par exemple un diabète de type 1 non contrôlé, la glycémie peut alors atteindre  $\sim 20$  mM (hyperglycémie). Par opposition, un surplus d'insuline peut entraîner une chute de la glycémie pouvant mener à l'hypoglycémie ( $\sim 2,5$  mM). Autant l'hypoglycémie que l'hyperglycémie entraînent un déséquilibre métabolique qui se caractérise par de multiples symptômes : polyurie, polydipsie, palpitations, transpiration et tremblements. L'homéostasie glucidique est donc essentielle au bon fonctionnement des cellules de l'organisme et un dérèglement des mécanismes régulateurs est néfaste et peut, lorsque la situation se prolonge, devenir mortel.

### **1.2.1 Rôle du foie dans l'homéostasie du glucose**

Le tissu musculaire n'est pas impliqué dans l'homéostasie glucidique puisqu'il est dépourvu de l'enzyme nécessaire, la glucose 6-phosphatase, pour rediriger le glucose dans le sang. Le glycogène musculaire sert donc de réserve énergétique pour la contraction musculaire, mais uniquement pour le muscle dans lequel il est contenu. Seuls le foie et les reins possèdent l'enzyme glucose 6-phosphatase. Toutefois, dans des conditions physiologiques normales, le foie est la principale source endogène de glucose. La contribution des reins n'est requise que lors d'un jeûne prolongé, d'une acidose ou dans des conditions d'hyperthyroïdie (Cersosimo et col. 2000 ; Pimenta et col. 1999). Le foie



produit le glucose via l'activation de deux processus métaboliques : la glycogénolyse et la néoglucogenèse. La glycogénolyse, c'est-à-dire la dégradation du glycogène emmagasiné en éléments glucidiques monomériques, est le processus le plus accessible pour satisfaire immédiatement à la demande périphérique de glucose. Le foie peut aussi libérer du glucose dans la circulation sanguine via l'activation de la néoglucogenèse où du glucose est formé à partir d'éléments non glucidiques tels le pyruvate, le lactate, l'alanine et le glycérol (Azzout et col. 1987). Le foie est donc un organe vital dans le métabolisme des glucides.

### **1.2.2 Régulation hormonale**

La régulation de l'homéostasie glucidique se fait via la coordination des activités du système nerveux qui stimule ou inhibe les sécrétions hormonales et endocrinien. Cependant, il est généralement entendu que la régulation du glucose sanguin est sous le contrôle du système endocrinien. Ainsi, la concentration de glucose sanguin est régulée par l'insuline et par les hormones de contre-régulation. Bien que le glucagon, l'adrénaline, le cortisol et l'hormone de croissance possèdent tous une activité biologique capable de s'opposer à l'action de l'insuline, le glucagon semble encore être la principale hormone responsable de la défense contre l'hypoglycémie (Cryer 1997, 1999 ; Butler et col. 1989 ; Tuttle et col. 1988). En l'absence de glucagon, l'adrénaline devient importante. Le cortisol et l'hormone de croissance tiennent plutôt un rôle lors de la récupération suite à une hypoglycémie aiguë. L'insuline et le glucagon sont donc les hormones principales de la régulation du glucose sanguin. De plus, selon Lins et col. (1983), le ratio insuline / glucagon est crucial puisqu'une faible diminution de la concentration d'insuline

rend le foie plus sensible aux effets du glucagon qui augmente la production de glucose se traduisant par une hyperglycémie, et ce, même avec une augmentation minimale de la glucagonémie.

## **2 Régulation de la glycémie à l'exercice**

### **2.1 Rôle du foie**

L'exercice augmente considérablement les demandes métaboliques de l'organisme, principalement par l'augmentation des besoins énergétiques des muscles qui se contractent (Kjaer et col. 1991 ; Richter et col. 1984). Le glucose représente un carburant important pour les cellules musculaires au travail et l'augmentation de son utilisation lors de l'exercice représente un défi de taille pour le maintien de la glycémie. Jusqu'à tout récemment, il était généralement reconnu chez l'Homme que les reins n'étaient pas une source appréciable de glucose sauf lors d'acidose ou après un jeûne prolongé. De nouvelles techniques permettent maintenant d'établir la contribution des reins à la production de glucose au repos (Cersosimo et col. 1999; Gerich et col. 2001) et permettront de déterminer leur participation à l'exercice de courte et de longue durée. Cependant, sans ces nouvelles données, il est encore prématuré d'envisager une contribution des reins à la production endogène de glucose à l'exercice, laissant le foie comme principale source endogène de glucose (Wahren et col. 1971). Bien que des périodes d'hypoglycémie et d'hyperglycémie puissent survenir dans certaines conditions extrêmes (Ahlborg et col. 1974, 1982 ; Kjaer et col. 1986), la glycémie demeure relativement stable lors d'une activité physique d'intensité modérée et de durée moyenne (Felig et col. 1979 ; Wolfe et col. 1986 ; Sheen et col. 1998).

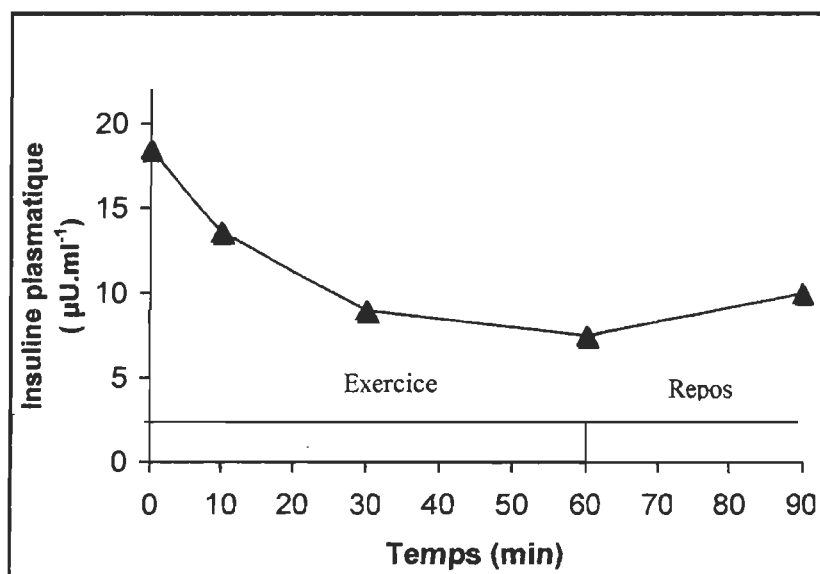
Cet équilibre entre l'utilisation et la production de glucose requiert une augmentation via le foie de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse afin de contrebalancer l'utilisation accrue de glucose par les muscles squelettiques lors d'une activité physique.

## **2.2 Régulation hormonale**

L'activité d'intensité modérée entraîne des variations hormonales qui se traduisent par une diminution de la concentration plasmatique d'insuline et une augmentation de la concentration plasmatique de glucagon (Gyntelberg et col. 1977 ; Del Corral et col. 1998 ; Krishna et col. 2000) tel qu'illustré à la figure 1a et 1b.

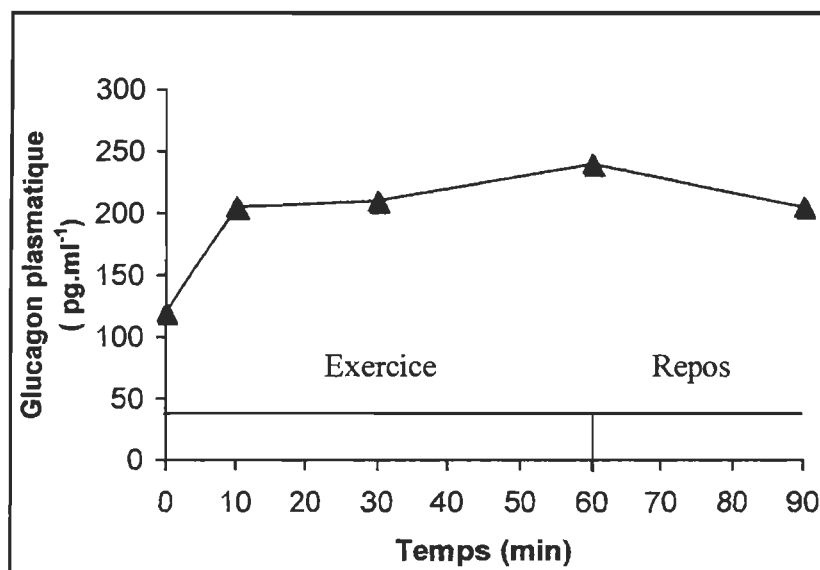
La régulation de la production hépatique de glucose semble varier en fonction de l'intensité de l'activité physique. Les études chez l'Homme ont démontré que la production de glucose lors d'un exercice d'intensité modérée ( $< 60 \% \dot{V}O_2 \text{ max}$ ) était principalement modulée par des modifications du ratio glucagon / insuline (Wolfe et col. 1986 ; Hirsch et col. 1991) bien que les catécholamines, en particulier l'adrénaline, soient importantes lorsque ces modifications ne survenaient pas (Marker et col. 1991). Pourtant, à l'exercice d'intensité élevée ( $> 80 \% \dot{V}O_2 \text{ max}$ ) les changements d'insuline et de glucagon seraient insuffisants pour stimuler l'augmentation majeure de glucose (+ 8 fois) (Coggan et col. 1997 ; Sigal et col. 1996). Ainsi, selon l'étude de Howlett et collaborateurs (1999), l'augmentation marquée d'adrénaline lors d'un exercice de haute intensité serait responsable d'environ 30 % de l'augmentation de la production hépatique de glucose.

Figure 1a. Effet d'une période d'exercice d'intensité modérée de 60 min sur la concentration plasmatique d'insuline.



Adaptée de : Gyntelberg 1977.

Figure 1b. Effet d'une période d'exercice d'intensité modérée de 60 min sur la concentration plasmatique de glucagon.



Adaptée de : Gyntelberg 1977.

### **2.3 Hormones contre-régulatrices**

Plusieurs études utilisant la somatostatine pour inhiber les sécrétions endogènes d'insuline et de glucagon ont démontré que l'augmentation du glucagon chez le chien à l'exercice serait responsable de l'augmentation de la glycolyse et de la néoglucogenèse (Wasserman et col. 1984, 1989 a, 1989 c). La participation du glucagon dans l'augmentation de la production hépatique de glucose à l'exercice a été estimée à 60% par Wasserman et collaborateurs (1988). En outre, Lavoie et col. (1997) ont démontré, dans un type similaire d'étude, que le glucagon était essentiel à l'augmentation de la production hépatique de glucose et, par le fait même, au maintien de la glycémie, lors d'un exercice prolongé d'intensité modérée chez des sujets sains. Bien que la chute de l'insuline et l'augmentation de glucagon soient importantes, il semble que le ratio molaire glucagon / insuline soit un facteur déterminant dans l'importance de l'augmentation de la production hépatique de glucose induite par l'exercice (Hirsch et col. 1991 ; Turcotte et col. 1997; Vranic et col. 1984). De fait, il a été mis en évidence que l'action du glucagon sur la production hépatique de glucose était plus marquée si celle-ci était conjuguée à une baisse d'insuline (Wasserman et col. 1988). De plus, les études de Wasserman et col. (1989 b) chez le chien, et Lavoie et col. (1997) chez l'humain ont démontré que la chute insulinémique était respectivement responsable de 50-60 % et de 70 % de l'accroissement de la production hépatique de glucose à l'exercice. Malgré l'augmentation d'adrénaline lors de l'exercice chez l'Homme, cette hormone ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans l'augmentation de la production

hépatique de glucose lors d'activités physiques (Howlett et col. 1999). Ainsi donc, le glucagon et l'insuline jouent un rôle primordial quant à l'augmentation de la production hépatique à l'exercice.

### **3 Effet de l'entraînement en endurance sur la régulation hormonale**

L'entraînement en endurance améliore l'homéostasie glucidique. Ainsi, dans des conditions identiques d'exercice, il a été démontré que les animaux sédentaires présentaient une hypoglycémie, absente chez les animaux entraînés (Donovan et col. 1997). Cette résistance à l'hypoglycémie a été établie comme étant le résultat d'une augmentation de la production hépatique de glucose (Donovan et col. 1997).

L'activité physique d'une intensité modérée provoque une augmentation du glucagon (Wasserman et col. 1989b ; Lavoie et col. 1997) et une diminution de l'insuline (Wasserman et col. 1989a ; Lavoie et col. 1997). Ces changements hormonaux ont pour effet de stimuler la production hépatique de glucose de façon à répondre à son utilisation périphérique et ainsi maintenir une glycémie relativement constante. L'entraînement en endurance modifie ces variations hormonales. Ainsi, pour une même intensité relative d'exercice, la diminution de la concentration d'insuline et l'augmentation de la concentration de glucagon sont moindres avec l'entraînement, tel qu'illustré à la figure 2a et 2b (Gyntelberg et col. 1977 ; Winder et col. 1982 ; Mendenhall et col. 1994). Paradoxalement, en présence d'une plus grande quantité d'insuline et d'une moins grande quantité de glucagon, l'entraînement en endurance semble résulter en une meilleure

homéostasie glucidique et demeure à être élucidé. L'effet de l'entraînement en endurance sur les modifications de sensibilité à l'insuline est bien connu au niveau musculaire (Dohm et col. 1987 ; Kim et col. 1999 ; Stallknecht et col. 2000), mais demeure peu documenté pour le foie. Une seule étude de Bonen et col. (1986) a montré que l'exercice chronique n'avait aucun effet sur la sensibilité du foie à l'insuline. Cependant, des études menées chez l'Homme par Drouin et col. (1998) et chez le Rat par Cheeks et col. (1996) ont démontré que l'entraînement en endurance induisait une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon.

### **3.1 Étude de Drouin et collaborateurs**

L'entraînement en endurance a été associé à une augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon. Drouin et collaborateurs (1998) ont démontré que l'entraînement en endurance augmentait la production hépatique de glucose en réponse à une infusion de glucagon chez l'humain. Dans cette étude, les sujets sédentaires et entraînés ont été étudiés au repos. Les procédures adoptées ont été l'inhibition des sécrétions endogènes d'insuline et de glucagon par infusion de somatostatine et leur remplacement dans le but d'obtenir des concentrations physiologiques identiques dans les deux groupes. L'infusion d'une même dose de glucagon a résulté en une production hépatique de glucose de 53 % supérieure chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires ( $15,8 \pm 2,8$  versus  $7,4 \pm 1,6$  mol $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ , respectivement). De plus, des données préliminaires, obtenues par notre laboratoire (Drouin et col. 2000 ; Lavoie et col. 2000) ainsi que par Cheeks et collaborateurs (1996) lors de perfusion de foie *in situ*, ont montré que la glycogénolyse

autant que la néoglucogenèse étaient significativement plus élevées lors d'une stimulation par le glucagon chez les rats entraînés que chez les rats sédentaires. Quels sont les mécanismes responsables de cette meilleure réponse du foie au glucagon induite par l'entraînement en endurance ? Parmi les facteurs susceptibles de traduire la réponse au glucagon, les récepteurs occupent une place de choix et demeurent non caractérisés.

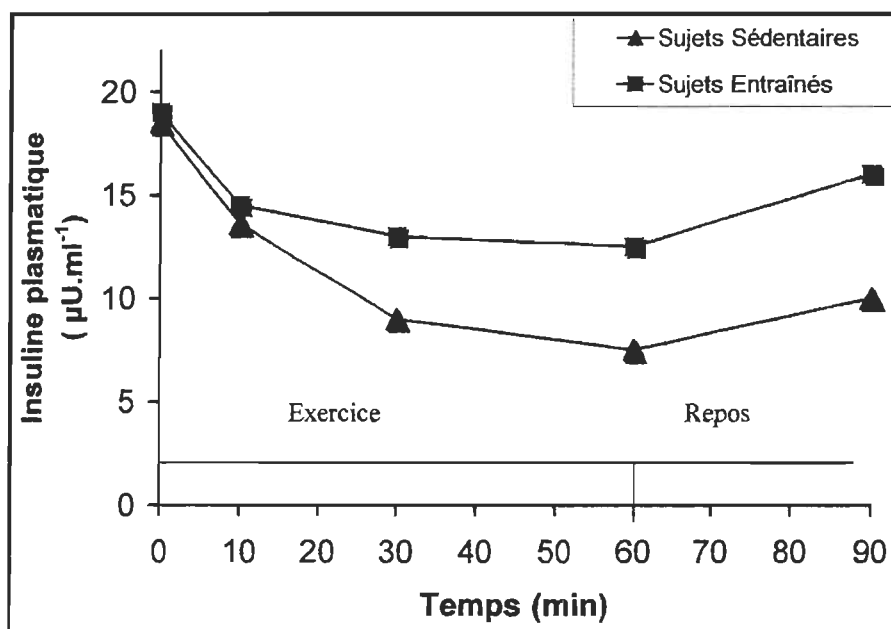
### **3.2 Étude de Nieto et collaborateurs**

Comme il en a été fait mention ci-haut, la littérature actuelle ne fournit aucune information directe concernant l'impact de l'entraînement en endurance sur les propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon. Seule l'étude de Nieto et collaborateurs (1996) permet d'obtenir des informations indirectes à ce sujet. Ainsi, lorsque stimulée par le glucagon, l'activité de l'adénylate cyclase est de 14,3 % ( $P < 0,005$ ) supérieure chez les rats entraînés en endurance comparativement aux rats sédentaires. L'augmentation de l'activation de l'adénylate cyclase sous influence hormonale suite à un entraînement en endurance peut être causée par un accroissement du nombre ou de l'affinité d'un récepteur hormonal. Or, au moins deux types de récepteurs hépatiques principaux sont couplés à un système adénylate cyclase, soit les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et les récepteurs du glucagon. De ces deux récepteurs, seul le récepteur  $\beta$ -adrénergique a été caractérisé lors de l'étude de Nieto et collaborateurs (1996). Ils ont démontré qu'il n'y avait aucune différence significative d'affinité et de densité pour les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques entre les groupes sédentaires et entraînés. Il est donc possible que des changements de propriété du récepteur



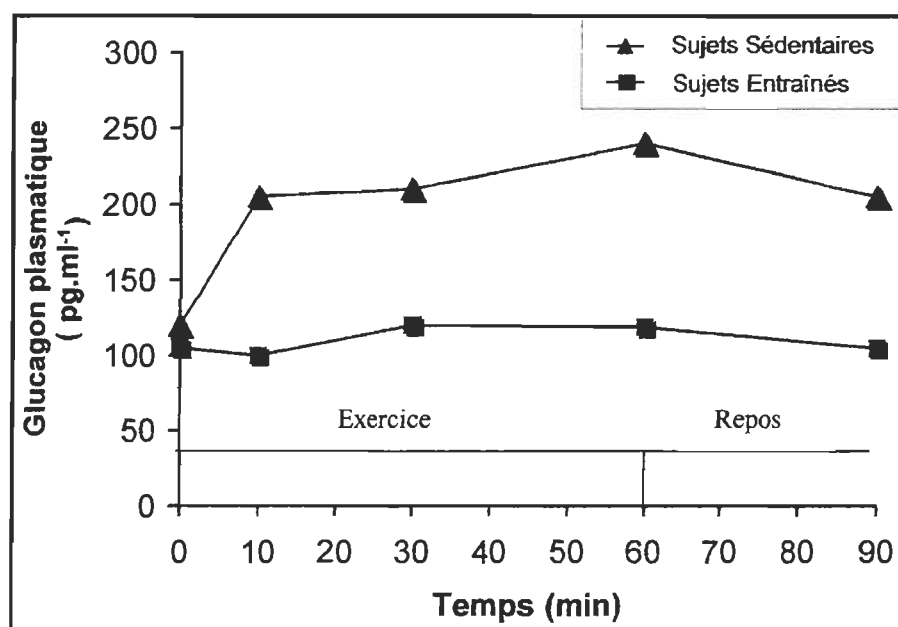
du glucagon soient à l'origine de l'augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase tel que rapportée par Nieto et collaborateurs 1996.

Figure 2a. Effet de l'entraînement en endurance sur la concentration plasmatique d'insuline lors d'une activité physique d'intensité modérée.



Adaptée de : Gyntelberg 1977.

Figure 2b. Effet de l'entraînement en endurance sur la concentration plasmatique de glucagon lors d'une activité physique d'intensité modérée.



Adaptée de : Gyntelberg 1977

#### **4 Récepteurs du glucagon**

Le glucagon est un polypeptide hormonal constitué d'une chaîne linéaire de 29 acides aminés (Unson et col. 1998). Le glucagon est le résultat de la protéolyse du proglucagon, un précurseur de 180 acides aminés, dans les cellules alpha du pancréas endocrine (MacNeil et col. 1994). L'organe cible principal du glucagon est le foie où, conjointement avec l'insuline, il joue un rôle primordial dans le maintien d'une concentration normale de glucose essentielle à la survie de l'organisme tel que décrit précédemment. L'événement initial dans l'action du glucagon est sa liaison à son récepteur situé à la surface des hépatocytes. Un signal intracellulaire est ainsi transmis à travers la membrane plasmique aux protéines G, effecteurs intracellulaires, initiant une cascade d'événements d'amplification qui auront pour point culminant la production de glucose.

Le récepteur du glucagon est un récepteur membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Christophe 1995). Les récepteurs membranaires se lient à des molécules hydrosolubles complémentaires et sont généralement localisés dans la membrane externe de la cellule cible. Ils se divisent en quatre catégories : les récepteurs comportant des tunnels à ions, les récepteurs à activité enzymatique, les récepteurs dépourvus d'activité catalytique et les récepteurs couplés aux protéines G (Lodish et col. 1997). La superfamille des récepteurs couplés aux protéines G compte plus de 1000 différents récepteurs dont le premier fut cloné il y a à peine une décennie (Kolakowski 1994). Les caractéristiques communes à cette famille de récepteurs sont une structure comprenant sept (7) domaines transmembranaires et une capacité à recruter et

réguler l'activité intracellulaire des protéines G hétérotrimériques (Nakamura et Redbell 1991) composées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (figure 3). Cette famille de récepteurs se subdivise en trois familles tel qu'illustré à la figure 4 : la famille A : composée des récepteurs de type rhodopsine et bêta-adrénergique (adrénaline, sérotonine, dopamine, acétylcholine, histamine), la famille B : composée des récepteurs de type Glucagon/VIP/Calcitonine (calcitonine, glucagon, Glucagon-like peptide, peptide vasoactif intestinal, sécrétine) et la famille C : composée des récepteurs de type neurotransmetteurs métabotropiques et calcium (GABA, glutamate, calcium). Le récepteur du glucagon fait donc partie de la famille B de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G.

Le récepteur du glucagon consiste en une protéine intégrale de la membrane plasmique d'un poids moléculaire d'environ 55 kDa. Comme chacun des membres de cette famille, la chaîne d'acides aminés de ce récepteur comporte sept tronçons de 20-25 résidus hydrophobes chacun formant une hélice alpha transmembranaire (Böhm et col. 1997). De plus, le récepteur est constitué d'un segment extracellulaire N-terminal, de trois boucles extracellulaires, de trois boucles intracellulaires, et d'un segment intracellulaire C-terminal (figure 5). Il est principalement exprimé dans les hépatocytes, mais il est aussi présent dans d'autres tissus soient : le cœur, le pancréas, les reins, le cerveau, l'estomac, les intestins, et certains adipocytes (Christophe 1995 ; Yamato et col. 1997).

Jusqu'au début des années 1990, certains chercheurs dont Wakelam et col. (1986) et Petersen et Bear (1986) suggéraient l'existence de deux types de récepteurs distincts du

glucagon : GR-1 et GR-2. Le récepteur GR-1 était associé au second messenger inositol 1,4,5-*tris*-phosphate qui entraîne la libération de calcium de la lumière du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme cellulaire. Tandis que le récepteur GR-2 était associé au second messenger AMP cyclique. Aujourd'hui, les techniques de clonage ont permis de démontrer l'existence d'un seul récepteur du glucagon chez l'humain (MacNeil et col. 1994) et chez le rat (Jelinek et col. 1993). Ces études ont montré que la stimulation au glucagon des cellules BHK (baby hamster kidney) contenant un plasmide codant pour le gène du récepteur du glucagon provoquait un accroissement à la fois de la concentration d'AMP cyclique et du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (via l' $\text{IP}_3$ ) (Hansen et col. 1998). Le récepteur du glucagon transmet donc ses signaux intracellulaires via deux messagers seconds soient : l'AMP 3'-5'-cyclique et l'inositol 1,4,5 trisphosphate (figure 6), ces événements se déroulant par l'entremise de protéines G distinctes (Tableau 1) (Christophe 1995 ; Jelinek et col. 1993 ; Li et col. 1997). De plus, il a été démontré par Hanse et col. (1998) que les récepteurs du glucagon ont la capacité de se lier à de multiples protéines G, confirmant l'activation de deux voies de signalisation distinctes pour un même récepteur.

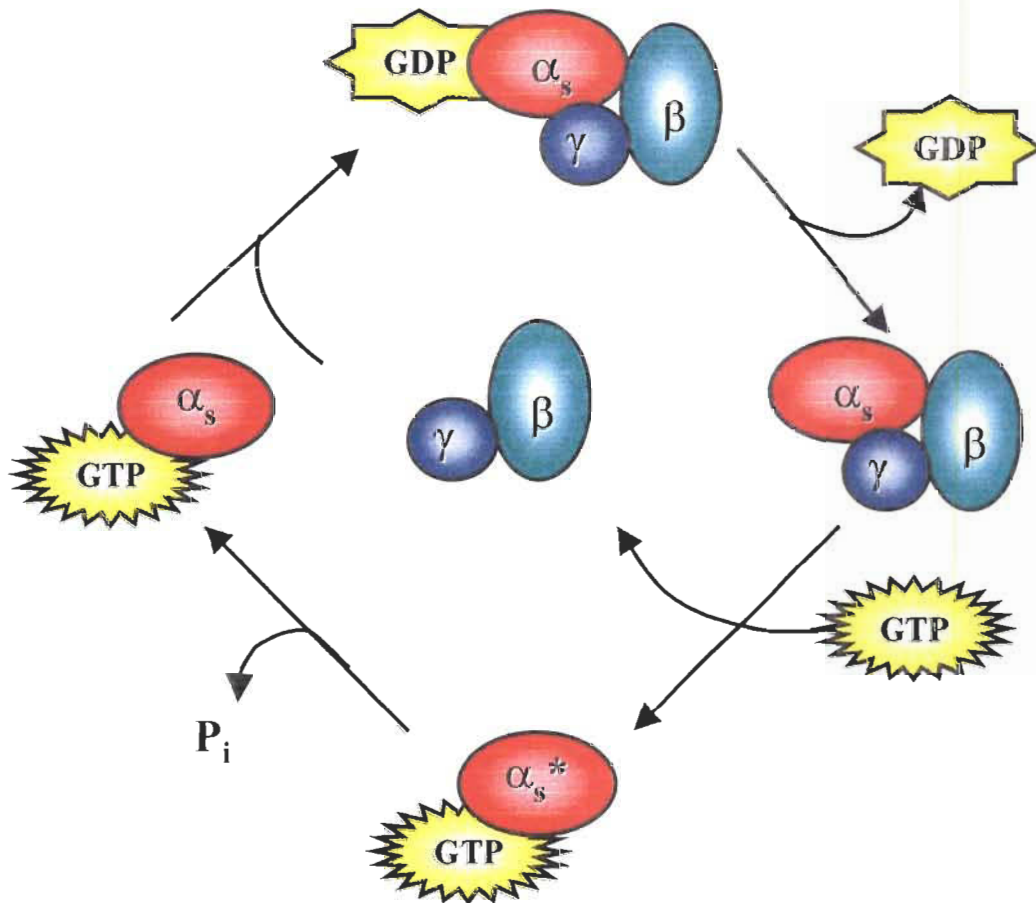


Figure 3. Schéma simplifié du cycle de régulation de la protéine  $G_s$ . L'activation de  $G_s$  est justifiée par l'échange du GDP pour du GTP sur la sous-unité  $\alpha_s$ . Une fois activé, le complexe  $\alpha_s^*\beta\gamma$  se dissocie afin que les protéines  $G_{s\alpha}$  et  $G_{\beta\gamma}$  puissent interagir avec les effecteurs appropriés. L'hydrolyse du GTP par  $G_{s\alpha}$  le désactive, augmentant ainsi son affinité pour  $G_{\beta\gamma}$ , et conduit à leur réassociation pour donner le complexe inactif  $G_{s\alpha\beta\gamma} \cdot \text{GDP}$ .

Adaptée de : Novotny & Svoboda 1998

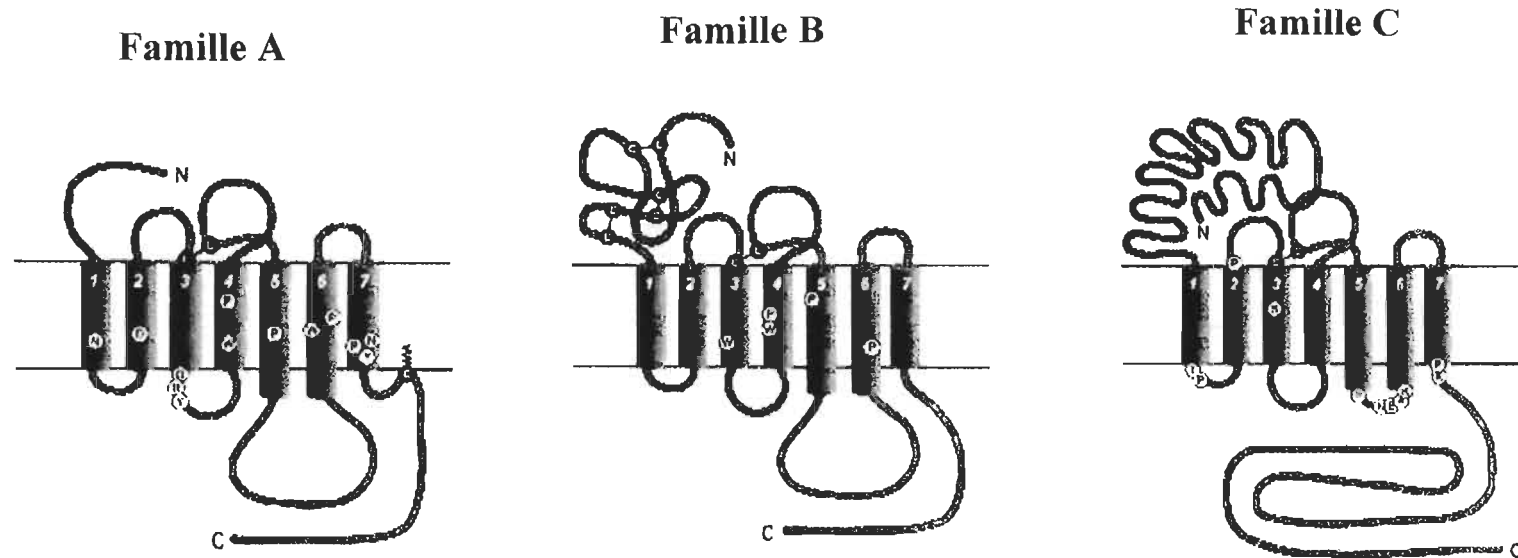


Figure 4. Représentation schématique de la sous-division de la superfamille des récepteurs liés aux protéines G.

Famille A : récepteurs de type rhodopsine et bêta-adrénergique

Famille B : récepteurs de type Glucagon/VIP/Calcitonine.

Famille C : récepteurs de type neurotransmetteurs métabotropiques et calciques .

Adaptée de : Gether 2000.

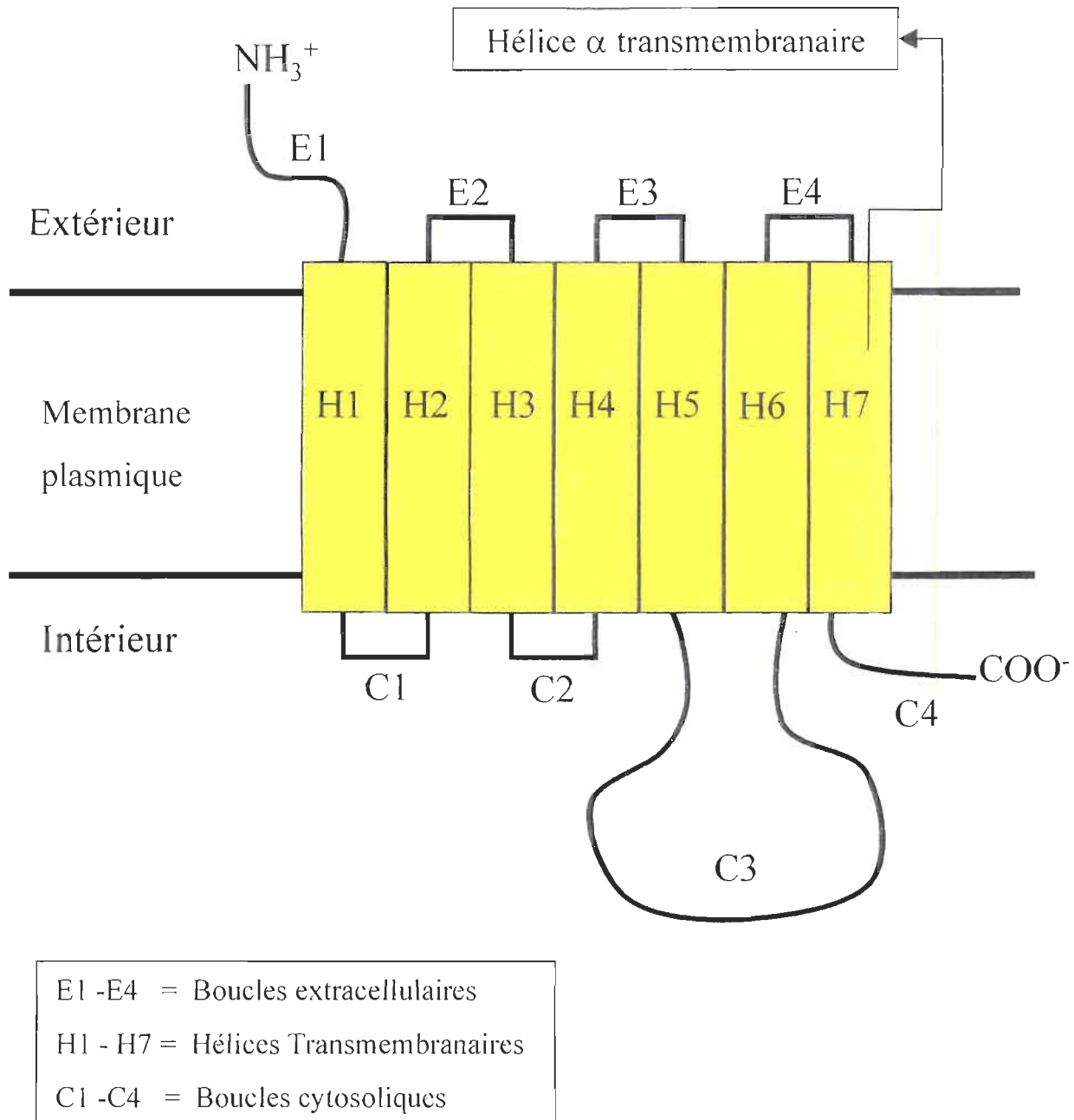


Figure 5. Disposition schématique des segments d'une chaîne de récepteur lié à une protéine G. Adaptée de : Lodish et col. 1997.



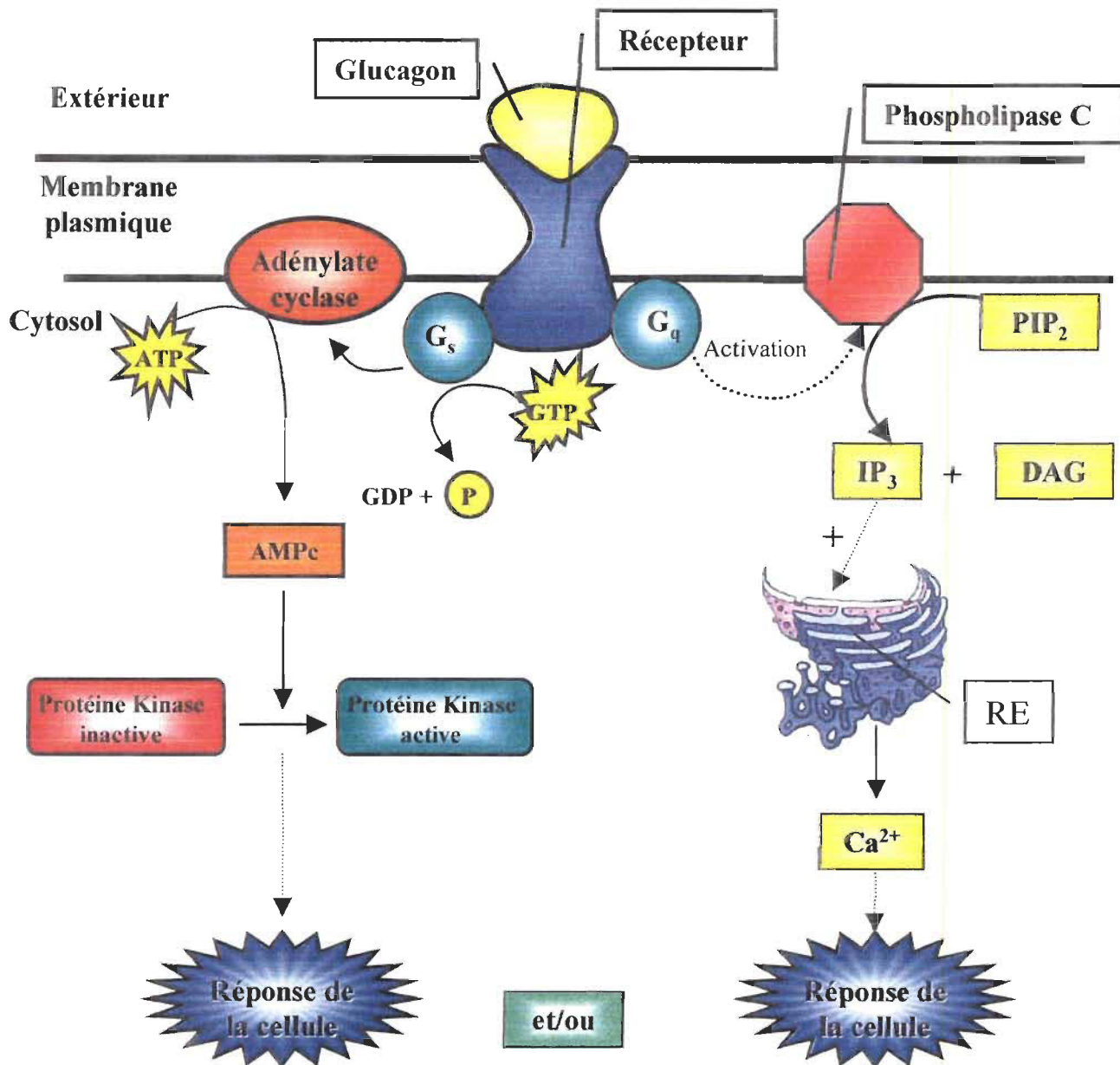


Figure 6. Fixation du glucagon à son récepteur. La protéine  $G_s$  relaie le signal hormonal vers l'adénylate cyclase.  $G_s$  passe de la forme passive, chargée de GDP, à la forme active, chargée de GTP. Une fois produit, l'AMP cyclique agit comme second messenger à l'intérieur de l'hépatocyte de manière à activer des protéines kinases qui induisent les réponses au glucagon. Et/ou activation de la protéine  $G_q$  et hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) par la phospholipase C. Cette réaction produit deux composés importants: le 1,2-diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5 trisphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> diffuse vers la surface du réticulum endoplasmique (RE), se lie à des tunnels à Ca<sup>2+</sup> sensible à l'IP<sub>3</sub> provoquant l'ouverture du tunnel permettant aux ions Ca<sup>2+</sup>, qui régissent diverses réponses cellulaires, de passer du RE au cytosol. Adaptée de : Lodish et col. 1997.

**Tableau 1.** Propriétés des protéines G liées à des récepteurs à sept domaines transmembranaires.

Sous-Classe* $G_\alpha$	Effet	Protéine effectrice associée	Second messenger
$G_s$	↑	Adénylate cyclase	AMPc
	↑	Conducteur à $Ca^{2+}$	$Ca^{2+}$
	↓	Conducteur à $Na^+$	Variation du potentiel membranaire
$G_i$	↓	Adénylate cyclase	AMPc
	↑	Conducteur à $K^+$	Variation du potentiel membranaire
	↓	Conducteur à $Ca^{2+}$	$Ca^{2+}$
$G_q$	↑	Phospholipase C	$IP_3$ , DAG
$G_o$	↑	Phospholipase C	$IP_3$ , DAG
	↓	Conducteur à $Ca^{2+}$	$Ca^{2+}$
$G_t$	↑	Phosphodiesterase GMPc-dépendante	GMPc

\* $G_\alpha$  peut se trouver associé à plusieurs protéines effectrices. Il n'y a à ce jour qu'une seule  $G_\alpha$  principale d'identifiée, mais de nombreuses protéines  $G_{q\alpha}$  et  $G_{i\alpha}$  ont été décrites.

Code : ↑ = stimulation; ↓ = inhibition;  $IP_3$  = inositol 1,4,5- trisphosphate, DAG = 1,2-diacylglycérol.

Adapté de : Lodish et col. 1997.

#### **4.1 Caractérisation des récepteurs du glucagon**

Trois techniques existent pour caractériser les récepteurs hépatiques du glucagon soient : les épreuves fonctionnelles de radioliation (Frandsen et col. 1985), la quantification de l'ARN messenger (Bustin 2000; Yamato et col. 1997; Nishimura et col. 1996) avec hybridation *in situ*, immunobuvardage de type Northern, et l'étude du gène par clonage et séquençage (Jelinek et col. 1993; Portois et col. 1999). L'étude du gène a permis de déterminer la structure (Unson et col. 1995; Chicchi et col. 1997; Cypess et col. 1999) et la séquence (Geiger et col. 2000) du récepteur hépatique du glucagon ainsi que d'établir une homologie de 83 % entre le gène du récepteur du glucagon chez l'Homme et chez le Rat (Jelinek et col. 1993; MacNeil et col. 1994). La quantification de l'ARN messenger est utilisée afin de mesurer la capacité de transcription du gène en réaction à une substance chimique ou un ou plusieurs stimuli (Bustin 2000). Les épreuves fonctionnelles de radioliation sont utilisées pour détecter, doser et caractériser les récepteurs du glucagon afin d'obtenir la densité ( $B_{max}$ ) et l'affinité ( $K_D$ ). Elles constituent donc les premiers tests à effectuer lors de l'étude de la régulation d'un récepteur. Leur principe consiste à mesurer la capacité qu'a le glucagon radioactif de se fixer aux membranes plasmiques purifiées de foie contenant les récepteurs du glucagon (Lodish et col. 1997).

La fixation du glucagon :



est représentée par l'équation suivante :

$$K_D = \frac{[R][G]}{[RG]}$$

dans lesquelles [R] et [G] représentent les concentrations respectives du récepteur libre et du glucagon (ligand) et [RG] la concentration du complexe R•G.

La constante de dissociation du complexe R•G, c'est-à-dire le  $K_D$ , est une mesure de l'affinité du récepteur envers son ligand. Ainsi, plus la valeur du  $K_D$  est faible, plus l'affinité du récepteur à l'endroit de son ligand est élevée. De plus, la valeur du  $K_D$  représente la concentration de glucagon nécessaire pour occuper la moitié des récepteurs présents. Dans la littérature, les renseignements disponibles concernant les propriétés des récepteurs chez les rats sains indiquent que l'affinité ( $K_D$ ) du récepteur pour le glucagon se situe entre 0,1 et 1,2 nM et le nombre maximal de récepteurs se situe entre 1,8 et 3,0 pmol/mg de protéines (Desbuquois et Authier 1989; Lipson et col. 1988; Rojas et Birnhaumer 1985).

#### **4.2 Régulation du récepteur du glucagon**

Les mécanismes exacts impliqués dans les divers processus de régulation du récepteur du glucagon demeurent pour le moment non définis. Diverses études ont été réalisées dans le but d'identifier des régulateurs potentiels. Elles ont été menées à des

niveaux différents soit au niveau du gène (Portois et col. 1999; Svoboda et col. 1999), de l'expression de l'ARN messager (Abrahamsen et Nishimura 1995; Abrahamsen et col. 1995; Burcelin et col. 1998; Krones et col. 1998) et de l'expression des récepteurs dans les préparations de membranes plasmiques de foie (Bhathena et col. 1978 ; Dighe et col. 1984) et/ou à la surface des hépatocytes isolés (Abrahamsen et col. 1995). Suite à ces études, quelques régulateurs ont été identifiés tels le glucose (Abrahamsen et Nishimura 1995; Abrahamsen et col. 1995; Burcelin et col. 1998; Krones et col. 1998; Portois et col. 1999; Svoboda et col. 1999), l'AMP cyclique (Abrahamsen et Nishimura 1995; Abrahamsen et col. 1995), le glucagon (Bhathena et col. 1978; Dighe et col. 1984) et l'oxygène (Krones et col. 1998). Les effets de ces différents régulateurs sur les récepteurs du glucagon sont décrits dans le tableau 2.

**TABLEAU 2****Effet des différents régulateurs identifiés sur les récepteurs du glucagon.**

Régulateurs	Auteurs	Type d'étude	Effets sur les récepteurs du glucagon
↑ Glucose	Abrahamsen et col. 1995	<i>In vitro</i>	↑ dose-dépendante de l'ARNm
	Burcelin et col. 1998	<i>In vitro</i>	
	Krones et col. 1998	<i>In vitro</i>	
	Portois et col. 1999	<i>In vitro</i>	
↑ AMPc	Abrahamsen et col. 1995	<i>In vitro</i>	↓ 50 % de l'ARNm ↓ 65 % du nombre de récepteurs/cellule
	Bhathena et col. 1978	<i>In vivo</i>	↓ 42 % du nombre de récepteurs par cellule (rats diabétiques) ↓ 34 % du nombre de récepteurs par cellule (injection de glucagon)
↑ Glucagon	Burcelin et col. 1998	<i>In vivo</i>	↑ 250 % de l'ARNm du RG (rats diabétiques, après 19 jours sans insuline)
	Dighe et col. 1984	<i>In vivo</i>	↓ 40 % du nombre de récepteurs par mg de protéines (rats diabétiques)
↑ Oxygène	Krones et col. 1999	<i>In vitro</i>	↑ ARNm en présence [O <sub>2</sub> -périportale] (16 %) et non [O <sub>2</sub> -périvéneuse](8 %)

Ainsi, il a été démontré qu'une élévation de la concentration de glucose avait pour conséquence une augmentation dose-dépendante de l'expression de l'ARN messager du récepteur du glucagon (Abrahamsen et col. 1995; Burcelin et col. 1998; Krones et col. 1998). Ces résultats ont été confirmés par la découverte par Portois et collaborateurs (1999) d'un élément de réponse au glucose dans le promoteur du gène du récepteur du glucagon. Parmi les autres régulateurs cités ci-dessus, il y a l'AMP cyclique ou toutes substances capables d'augmenter ou de diminuer la concentration d'AMP cyclique. Les études effectuées par Abrahamsen et collaborateurs (1995a et b) au niveau des récepteurs pancréatiques et hépatiques du glucagon montrent que lorsque les hépatocytes sont incubés en présence de forskolin (un activateur direct de l'adénylate cyclase) ou d'IBMX (inhibiteur de l'activité de la phosphodiesterase), l'expression de l'ARN messager diminue de 50 et 25 % respectivement. Le nombre de récepteurs exprimés à la surface des hépatocytes passe quant à lui de  $1,0 \times 10^5$ /cellule à  $3,5 \times 10^4$ /cellule causant une diminution de 65 %. Ainsi donc, toute élévation de la concentration d'AMP cyclique abaisse à la fois l'expression de l'ARN messager du récepteur du glucagon et des récepteurs à la surface des hépatocytes. Un autre des régulateurs identifiés est l'oxygène. L'étude effectuée par Krones et collaborateurs (1999) montrent que lorsque des hépatocytes isolés sont incubés en présence à la fois d'une concentration croissante de glucose (5 à 50 mM) et d'une concentration d'oxygène périportale (16 %  $O_2$ ) ou périvéneuse (8 %  $O_2$ ), l'augmentation de l'expression de l'ARN messager du récepteur du glucagon ne se produit qu'en présence d'une concentration artérielle d'oxygène (16 %  $O_2$ ). Ils ont donc conclu que l'induction du gène du récepteur du glucagon était  $O_2$ -dépendante. Le dernier des régulateurs identifiés n'est nul autre que le glucagon pancréatique. Ainsi, une augmentation de la concentration

de glucagon allant jusqu'à l'hyperglucagonémie a été associée à une diminution de l'expression des récepteurs hépatiques du glucagon à la surface des hépatocytes (Bathena et col. 1978) et dans les préparations de membranes plasmiques (Dighe et col. 1984). L'hyperglucagonémie a été induite par l'injection d'un bolus de glucagon deux fois par jour durant une période de sept jours ou par injection de streptozotocine afin de créer une condition pathologique de diabète de type 1. Dans les deux cas, l'hyperglucagonémie a provoqué une diminution de 31 et 40 % respectivement du nombre de récepteurs du glucagon. À ce jour, aucune littérature n'est présentement disponible concernant l'impact de l'entraînement en endurance sur les récepteurs hépatiques du glucagon.

#### **4.3 Entraînement en endurance et régulation des récepteurs**

L'entraînement en endurance, autant chez les humains que chez les animaux, induit de multiples changements et ce, à plusieurs niveaux dans l'organisme (Duan et Winder 1994, Duclos et col. 2001; Giada et col. 1998; Phillips et col. 1996 ; Richter et col. 1998 ; Wittert et col. 1996 ; Wilmore et col. 2001). En dépit de toutes ces études, peu de changements ont été identifiés au niveau des récepteurs (tableau 3). Un des exemples de changement au niveau des récepteurs par l'entraînement en endurance est l'étude de Saborido et col. (1995) montrant une augmentation du nombre de récepteurs de la dihydropyridine dans les muscles à fibres lentes ( $\uparrow$  42 %) et dans les fibres rapides ( $\uparrow$  60 %) sans changement d'affinité. Ce récepteur joue un rôle crucial comme déclencheur de la sortie du calcium du réticulum sarcoplasmique. L'augmentation du nombre de récepteurs de la dihydropéridine pourrait donc jouer un rôle important dans l'adaptation des muscles



squelettiques à accroître leur activité contractile. Un autre exemple est celui de l'étude de Werle et col. (1990) où le nombre de récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques diminue de 13 % dans les muscles cardiaques suite à un entraînement en endurance sans toutefois modifier l'affinité. La stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques résulte en des effets chronotrope et inotrope. Ainsi, la diminution du nombre de ces récepteurs pourrait être un des mécanismes expliquant la diminution de fréquence cardiaque au repos retrouvée chez les athlètes. Ces études, ainsi que celles répertoriées dans le tableau 3, montrent que l'entraînement en endurance peut réguler positivement ou négativement un récepteur donné. Bien que peu d'études soient encore disponibles, il est clair que l'exercice chronique entraîne des modifications au niveau des propriétés de certains récepteurs de l'organisme.

TABLEAU 3

## Effet de l'entraînement en endurance sur différents récepteurs

Auteurs	Sujets	Entraînement	Récepteurs	Tissus	Résultats
Saborido et col., 1995	Rats mâles Wistar	Tapis roulant, 45 min à 25 m/min, 5 j/sem, durant 12 sem.	Dihydropyridine (Ca <sup>2+</sup> , réticulum sarcoplasmique)	Muscles	Fibre lente (soleus) : ↑ 42%
				Coeur	Fibre rapide (extensor digitorum longus) : ↑ 60%
Strüder et col., 1999	Hommes	Ergocycle	Serotonine-2A	Plaquettes	Aucun changement
Werle et col., 1990	Rats mâles Sprague-Dawley	Nage, 2h/j avec 1% de leur poids, 5j/sem, durant 6 sem,	Bêta-adrénergique	Coeur	↓ 13% de la densité Aucun changement d'affinité
Jost et col., 1989	Hommes	Nageurs	Bêta- adrénergique	Lymphocytes	Nageurs : ↓ 39% β, ↑ 25% α
		Marathoniens			Marathoniens : ↓ 17% β
		Haltérophiles	Alpha- adrénergique	Plaquettes	Haltérophiles : ↓ 33% α

TABLEAU 3 (SUITE)

Auteurs	Sujets	Entraînement	Récepteurs	Tissus	Résultats
Buckenmeyer et col., 1990	Rats mâles Sprague-Dawley	Tapis roulant, 1h/j durant 18 sem.	Bêta-adrénergique	Fibre musculaires	Type I : $\uparrow$ 19 % Type IIA : $\uparrow$ 25 % Type IIB : $\approx$
Bonen et col., 1986	Rats mâles Sprague-Dawley	Tapis roulant, 1h/j, 4j/sem durant 6 sem.	Insuline	Muscle Foie	$\uparrow$ 27 % de la liaison Aucun changement
Mazzeo et col., 1995	Rats Fisher 344	Tapis roulant, 1h/j, 5j/sem., durant 10 sem.	Bêta-adrénergique	Coeur Muscle (Soleus)	$\uparrow$ 21 % Aucun changement
Nieto et col., 1996	Rats mâles Wistar	Tapis roulant, 1h/j., 6j./sem, durant 12 sem.	Bêta-adrénergique	Foie (membrane plasmiques)	Kd : aucun changement Bmax : aucun changement
Qian et col., 1999	Rats femelles Sprague-Dawley	Nage, 2h/j durant 12 sem.	Transferrine	Érythroblaste	$\uparrow$ 95 %
Dohm et col. 1987	Rats Femelle Sprague-Dawley	Tapis roulant, 2h/j, 6 j/sem., durant 4 sem.	Insuline	Muscle (vastus intermedius)	K <sub>D</sub> : aucun changement Bmax : $\uparrow$ 55 %

## **5 Problématique**

Outre l'étude effectuée par Nieto et collaborateurs (1996), aucune donnée directe n'était disponible sur les effets de l'entraînement en endurance sur les récepteurs du glucagon. Ainsi, l'objectif de ce projet de maîtrise était de caractériser l'impact d'un entraînement en endurance sur les propriétés des récepteurs hépatiques au glucagon. Spécifiquement, nous voulions 1) mettre au point les techniques de purification des membranes plasmiques de foie et de radioliation pour les récepteurs hépatiques du glucagon, et 2) mesurer l'affinité ( $K_d$ ) et la densité ( $B_{max}$ ) des récepteurs hépatiques du glucagon suite à un programme d'entraînement en endurance à la nage chez des animaux sains. L'hypothèse de ce projet est que l'augmentation de la production hépatique de glucose chez les sujets entraînés (Drouin et col. 1998) à la suite d'une stimulation au glucagon pourrait provenir, entre autres, d'une augmentation du nombre et/ou de l'affinité des récepteurs du glucagon.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abrahamsen, N., & Nishimura, E. Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids. *Endocrinology*, 1995, *136*, 1572-1578.
- Abrahamsen, N., Lundgren, K., & Nishimura, E. Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270*, 15853-15857.
- Ahlborg, G., Felig, P., Hangenfeldt, L., Hendler, R., & Wahren, J. Substrate turnover during prolonged exercise in man. *J. Clin. Invest.*, 1974, *53*, 1080-1090.
- Alhborg, G., & Felig, P. Lactate and glucose exchange across the forearm, legs, and splanchnic bed during prolonged leg exercise. *J. Clin. Invest.*, 1982, *69*, 45-54.
- Azzout, B., Bois-Joyeux, B., Chanez, M., & Peret, J. Development of gluconeogenesis from various precursors in isolated rat hepatocytes during starvation or after feeding a high protein, carbohydrate-free diet. *J. Nutr.*, 1987, *117*, 164-169.
- Bhathena, S.J., Voyles, N.R., Smith, S., & Recant, L. Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J. Clin. Invest.*, 1978, *61*, 1488-1497.

- Böhm, S.K., Grady, E.F., & Bunnett, N.W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.*, 1997, 322, 1-18.
- Bonen, A., Clune, P.A., & Tan, M.H. Chronic exercise increases insulin binding in muscles but not liver. *Am. J. Physiol.*, 1986, 251, E196-E203.
- Buckenmeyer, P.J., Goldfarb, A.H., Partilla, J.S., Pineyro, M.A., & Dax, E.M. Endurance training, not acute exercise, differentially alters  $\beta$ -receptors and cyclase in skeletal fiber types. *Am. J. Physiol.*, 1990, 258, E71-E77.
- Burcelin, R., Mrejen, C., Decaux, J.F., De Mouzon, S.H., Girard, J., & Charron, M.J. *In vivo* and *in vitro* regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273 (14), 8088-8093.
- Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Mol. Endo.*, 2000, 25, 169-193.
- Butler, P.C., & Rizza, R.A. Regulation of carbohydrate metabolism and response to hypoglycemia. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1989, 18, 1-25.
- Cersosimo, E., Garlick, P., & Ferretti, J. Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am. J. Physiol.*, 1999, 276, E78-E84.
- Cersosimo, E., Garlick, P., & Ferretti, J. Renal substrate metabolism and gluconeogenesis during hypoglycemia in humans. *Diabetes*, 2000, 49, 1186-1193.
- Cheeks, A.M., Hevener, A.H., & Donovan, C.M. Enhanced hepatic gluconeogenic response to elevations in glucagon with endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 1996, 28, S58 # 347, (Résumé).

- Chicchi, G.G., Graziano, M.P., Koch, G., Hey, P., Sullivan, K., Vicario, P.P., & Cascieri, M.A. Alterations on receptor activation and divalent cation activation of agonist binding by deletion of intracellular domains of the glucagon receptor. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 7765-7769.
- Christophe J. Glucagon receptors : from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1241, 45-57.
- Coggan, A.R., Raguso, C.A., Gastaldelli, A., Williams, B.D. & Wolfe, R.R. Regulation of glucose production during exercise at 80%  $\text{VO}_2$  peak in untrained humans. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273, E348-E354.
- Cryer, P.E. Hierarchy of physiological responses to hypoglycemia: relevance to clinical hypoglycemia in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.*, 1997, 29, 92-96.
- Cryer, P.E. Hypoglycemia is the limiting factor in the management of diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 1999, 15, 42-46.
- Cypess, A.M., Unson, C.G., Wu, C.R., Sakmar, T.P. Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 19455-19464.
- Del Corral, P., Howley, E.T., Hartsell, M., Ashraf, M. & Younger, M.S. Metabolic effects of low cortisol during exercise in humans. *J. Appl. Physiol.*, 1998, 84, 939-947.
- Desbuquois, B. & Authier, F. Récepteur du glucagon. *Ann. Endo. (Paris)*, 1989, 50, 440-446.

- Dighe, R.R., Rojas, F.J., Birnbaumer, L., & Garber, A.J. Glucagon-stimulable adenylyl cyclase in rat liver: The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 1984, 73, 1013-1023.
- Dohm, G.L., Sinha, M.K., & Caro, J.F. Insulin receptor binding and protein kinase activity in muscles of trained rats. *Am. J. Physiol.*, 1987, 252, E170-E175.
- Donovan, C.M. & Sumida, K.D. Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am. J. Physiol.*, 1990, 258 (3 Pt 2), R770-R776.
- Donovan, C.M., & Sumida, K.D. Training enhanced hepatic gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 1997, 29, 628-634.
- Drouin, R., Lavoie, C., Bourque, J., Ducros, F., Poisson, D., & Chiasson, J.-L. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am. J. Physiol.*, 1998, 274, E23-E28.
- Drouin, R., Milot, M., Robert, G., Massicotte, D., Péronnet, F., & Lavoie, C. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: Effect mediated by increased glycogenolysis. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2000, 32, S224 #1061 (Résumé).
- Duan, C., & Winder, W.W. Effect of endurance training on activators of glycolysis in muscle during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 1994, 76 (2), 846-852.
- Duclos, M., Corcuff, J.B., Pehourcq, F., & Tabarin, A. Decreased pituitary sensitivity to glucocorticoids in endurance-trained men. *Eur. J. Endocrinol.*, 2001, 144 (4), 363-368.
- Felig, P. & Wahren, J. The role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production during exercise. *Diabetes*, 1979, 28, 71-75.



- Frandsen, E.K., Thim, L., Moody, A.J., & Markussen, J. Structure-function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21). *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 7581-7584.
- Geiger, A., Decaux, J.F., Burcelin, R., Le Cam, A., Salazar, G., Charron, M.J., Girard, J., Kervran, A. Structural and functional characterizations of the 5'-flanking region of the mouse glucagon receptor gene: comparison with the rat gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 272, 912-921.
- Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., & Stumvoll, M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*, 2001, 24, 382-391.
- Gether, U. Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocrine Reviews*, 2000, 21, 90-113.
- Giada, F., Bertaglia, E., De Piccoli, B., Franceschi, M., Sartori, F., Raviele, A., & Pascotto, P. Cardiovascular adaptations to endurance training and detraining in young and older athletes. *Int. J. Cardiol.*, 1998, 65 (2), 149-155.
- Gyntelberg, F., Rennie, M.J., Hickson, R.C. & Holloszy, J.O. Effect of training on the response of plasma glucagon to exercise. *J. Appl. Physiol.*, 1977, 43(2), 302-305.
- Hansen, L.H., Gromada, J., Bouchelouche, P., Whitmore, T., Jelinek, L., Kindsvogel, W. & Nishimura, E. Glucagon-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors. *Am. J. Physiol.*, 1998, 274, C1552-C1562.
- Hirsch, I.R., Marker, J.C., Smith, L.J., Spina, R.J., Parvin, C.A., Hollosky, J.O. & Cryer, P.E. Insulin and glucagon in prevention of hypoglycemia during exercise in humans. *Am. J. Physiol.*, 1991, 260, E695-E704.
- Howlett, K., Febbraio, M., & Hargreaves, M. Glucose production during strenuous exercise in humans: role of epinephrine. *Am. J. Physiol.*, 1999, 276, E1130-E1135.

- Hultman, E. Fuel selection, muscle fibre. *Proc. Nutr. Soc.*, 1995, 54, 107-121.
- Jelinek, L.J., Lok, S., Rosenberg, G.B., Smith, R.A., Grant, F.J., Biggs, S., Bensch, P.A., Kuijper, J.L., Sheppard, P.O., Sprecher, C.A., & col. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science*, 1993, 259, 1614-1616.
- Jost, J., WeiB, M., & Weicker, H. Comparison of sympatho-adrenergic regulation at rest and of the adrenoceptor system in swimmers, long-distance runners, weight lifters, wrestlers and untrained men. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 1989, 58, 596-604.
- Kim, Y.B., Inoue, T., Nakajima, R., Shirai-Morishita, Y., Tokuyama, K., & Suzuki, M. Effect of long-term exercise on gene expression of insulin signaling pathway intermediates in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 254, 720-727.
- Kjaer, M., Farrel, P.A., Christensen, N.J. & Galbo, H. Increased epinephrine response and inaccurate glucoregulation in exercising athletes. *J. Appl. Physiol.*, 1986, 61, 1693-1700.
- Kjaer, M., Kiens, M., Hargreaves, M., & Richter, E.A. Influence of active muscle mass on glucose homeostasis during exercise in humans. *J. Appl. Physiol.*, 1991, 71, 552-557.
- Kolakowski, Jr L.F. GCRDb : a G-protein-coupled receptor database. *Receptor Channels*, 1994, 2, 1-7.
- Krishna, M.G., Coker, R.H., Lacy, D.B., Zinker, B.A., Halseth, A.E. & Wasserman, D.H. Glucagon response to exercise is critical for accelerated hepatic glutamine metabolism and nitrogen disposal. *Am. J. Physiol.*, 2000, 279, E638-E645.

- Krones, A., Kietzmann, T., & Jungermann, K. Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett.*, 1998, 421, 136-140.
- Lavoie, C., Drouin, R., Milot, M., Robert, G., Massicotte, D., & Péronnet, F. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: Effect mediated by increased gluconeogenesis. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2000, 32, S24 # 1062 (Résumé).
- Lavoie, C., Ducros, F., Bourque, J., Langelier, H., & Chiasson, J.L. Glucose metabolism during exercise in man : the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, 75, 26-35.
- Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A., & Routh, V.H. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am. J. Physiol.* , 1999, 276, R1223-31.
- Li, J., Larroca, J.N., Rodriguez-Gabin, A.G., & Charron., M.J. Expression and signal transduction of the glucagon receptor in BTC3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1356, 229-236.
- Lins, P., Wajngot, A., Adamson, U., Vranic, M. & Ependic, S. Minimal increases in glucagon levels enhance glucose production in man with partial hypoinsulinemia. *Diabetes*, 1983, 32, 633-636.
- Lipson, K.E., Kolhatkar, A.A., Maki, R.G., & Donner, D.B.. Divalent cations regulate glucagon binding. Evidence for actions on receptor-Ns complexes and on receptors uncoupled from Ns. *Biochemistry*, 1988, 27, 1111-1116.
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira & Darnel. *Biologie moléculaire de la cellule*, DeBoeck Université, 1997, 859.

- MacNeil, D.J., Occi, J.L. Hey, P.J., Strader, C.D, & Graziano, M.P. Cloning and expression of a human glucagon receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 198,328-334.
- Marker, J.C., Hirsch, I.B., Smith, L.J., Parvin, C.A., Holloszy, J.O. & Cryer, P.E. Catecholamines in prevention of hypoglycemia during exercise in humans. *Am. J. Physiol.*, 1991, 260, E705-E712.
- Mazzeo, R.S., Podolin, D.A. & Henry, B. Effects of age and endurance training on  $\beta$ -adrenergic receptor characteristics in Fischer 344 rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1995, 84, 157-169.
- Mendenhall, L.A., Swanson, S.C., Habash, D.L., & Coggan, A.R. Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate-intensity exercise. *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, E136-E143.
- Nakamura, S.-I., & Rodbell, M. Glucagon induces disaggregation of polymer-like structures of the  $\alpha$  subunit of the stimulatory G protein in liver membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, 88, 7150-7154.
- Nieto, J.L., Diaz-Laviada, I., Guillen, A., & Haro, A. Effect of endurance physical training on rat liver adenylyl cyclase system. *Cell. Signal.*, 1996, 8, 317-322.
- Nishimura, E., Abrahamsen, N, Hansen, L.H., Lunddgren, K., & Madsen, O. Regulation of glucagon receptor expression. *Acta Physiol. Scand.*, 1996, 157, 329-332.
- Petersen, O.H., & Bear, C. Two glucagon transducing systems. *Nature*, 1986, 323, 18.

- Phillips, S.M., Han, X.X., Green, H.J., & Bonen, A. Increments in skeletal muscle GLUT-1 and GLUT-4 after endurance training in humans. *Am. J. Physiol.*, 1996, 270, E456-E462.
- Pimenta, W.P., & Silva Veiga, J.A. Increased glucose synthesis in renal tubule fragments from hyperthyroid rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1999, 77, 143-146.
- Portois, L., Maget, B., Tastenoy, M., Perret, J. & Svoboda, M. Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 8181-8190.
- Richter, E.A., Garetto, L.P., Goodman, M.N. & Ruderman, N.B. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise: modulation by local factor. *Am. J. Physiol.*, 1984, 246, E476-E482.
- Richter, E.A., Kristiansen, S., Wojtaszewski, J., Dagaard, J.R., Asp, S., Hespel, P., & Kiens, B. Training effects on muscle glucose transport during exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998, 441, 107-116.
- Rojas, F.J., & Birnhaumer, L. Regulation of glucagon receptor binding: Lack of effect of Mg and preferential role for GDP. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 7829-7835.
- Saborido, A., Molano, F., Moro, G., & Megias, A. Regulation of dihydropyridine receptor in skeletal and cardiac muscle by exercise training. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.*, 1995, 429, 364-369.
- Sheen, A.J., Buxton, O.M., Jison, M., Van Reeth, O., Leproult, R., L'hermite-Balériaux, M. & Van Cauter, E. Effects of exercise on neuroendocrine secretions and glucose regulation at different times of day. *Am. J. Physiol.*, 1998, 274, E1040-E1049.

- Siems, W.G., Sommerburg, O., & Grune, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin. Nephrol*, 2000, 53, S9-S17.
- Sigal, R.J., Fisher, S., Halter, J.B., Vranic, M. & Marliss, E.B.. The role of catecholamines in glucoregulation in intense exercise as defined as the islet cell clamp technique. *Diabetes*, 1996, 45, 148-156.
- Stallknecht, B., Larsen, J.J., Mikines, K.J., Simonsen, L., Bulow, J., & Galbo, H. Effect of training on insulin sensitivity of glucose uptake and lipolysis in human adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 2000, 279, E376-E385.
- Strüder, H.K., Hollmann, W., Platen, P., Wöstmann, R., Weicker, H. & Molderings, G.J. Effect of acute and chronic exercise on plasma amino acids and prolactin concentration and on [<sup>3</sup>H] Ketanserin binding to serotonin<sub>2A</sub> receptors on human platelets. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 1999, 79, 318-324.
- Svoboda, M., Portois, L., & Malaisse, W.J. Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1999, 68, 258-267.
- Turcotte, L.P., Srivastava, A.K., & Chiasson, J.-L. Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FAB-Pm) in red skeletal muscle. *Mol.Cell.Biochem.*, 1997, 166, 153-158.
- Tuttle, K.R., Marker, J.C., Dalsky, G.P., Schwartz, N.S., Shah, S.D., Clutter, W.E., Holloszy, J.O. & Cryer, P.E. Glucagon, not insulin, may play a secondary role in defense against hypoglycemia during exercise. *Am. J. Physiol.*, 1988, 254, E713-E719.

- Unson , C.G., Wu, C.R., Cheung, C.P. , & Merrifield, R.B. Positively charged residues at positions 12, 17, and 18 of glucagon ensure maximum biological potency. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 10308-10312.
- Unson, C.G., Cypess, A.M., Kim, H.N., Goldsmith, P.K., Carruthers, C.J.L., merrifield, R.B., & Sakmar, T.P. Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 27720-27727.
- Vranic, M., Gauthier, C., Bilinski, D., Wasserman, D., El Tayeb, K., Hetenyi, G. Jr. & Lickley, H.L. Catecholamine responses and their interactions with other glucoregulatory hormones. *Am. J. Physiol.*, 1984, 247, E145-E156.
- Wahren, J., P. Felig, G. Ahlborg, and L. Jorfeldt. Glucose metabolism during leg exercise in man. *J. Clin. Invest.*, 1971, 50, 2715-2725.
- Wakelam, M.J., Murphy, G.J., Hraby, V.J., & Houslay, M.D. Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature*, 1986,323, 68-77.
- Wasserman D.H., Williams, P.E., Lacy, D.B., Goldstein, R.E., & Cherrington, A.D. Exercise-induced fall in insulin and hepatic carbohydrate metabolism during muscular work. *Am. J. Physiol.*, 1989 a, 256, E500-E509.
- Wasserman, D.H., Lickley, H.L. & Vranic, M. Interactions between glucagon and other counterregulatory hormones during normoglycemic and hypoglycemic exercise in dogs. *J. Clin. Invest.*, 1984, 74(4), 1404-1413.
- Wasserman, D.H., Spalding, J.A., Bracy, D., Lacy, D.B., & Cherrington, A.D. Exercise-induced rise in glucagon and ketogenesis during prolonged muscular work. *Diabetes*, 1989 b, 38, 799-807.

- Wasserman, D.H., Spalding, J.A., Lacy, D.B., Colburn, C.A., Goldstein, R.E., & Cherrington, A.D. Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am. J. Physiol.*, 1989 c, 257, E108-E117.
- Wasserman, D.H., Williams, P.E, Lacy, D.B, Green, D.R., & and Cherrington, A.D. Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.*, 1988, 254, E518-E525.
- Werle, E.O., Strobel, G., & Weicker, H. Decrease in rat Beta<sub>1</sub> and Beta<sub>2</sub>- adrenoceptors by training and endurance exercise. *Life Sciences*, 1990, 46, 9-17.
- Wittert, G.A., Livesey, J.H., Espiner, E.A., Donald, R.A. Adaptation of the hypothalamopituitary adrenal axis to chronic exercise stress in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 1996, 28, 1015-1019.
- Wilmore, J.H., Stanforth, P.R., Gagnon, J., Rice, T., Mandel, S., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., & Bouchard, C. Cardiac output and stroke volume changes with endurance training: the HERITAGE Family Study. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2001, 33, 99-106.
- Winder, W.W., Beattie, M.A., & Holman, R.T. Endurance training attenuates stress hormone responses to exercise in fasted rats. *Am. J. Physiol.*, 1982, 243, R179-R184.
- Wolfe, R.R., Nadel, E.R., Shaw, J.H., Stephenson, L.A. & Wolfe, M.H. Role of changes in insulin and glucagon in glucose homeostasis in exercise. *J. Clin. Invest.*, 1986, 77, 900-907.



Yamato, E., Ikegami, H., Takekawa, K., Fujisawa, T., Nakagawa, Y., Hamada, Y., Ueda, H., & Ogihara, T. Tissue-specific and glucose-dependent expression of receptor genes for glucagon and glucagon-like peptide-1(GLP-1). *Horm. Metab. Res.*, 1997, 29, 56-59.

## CHAPITRE 2

**Augmentation de la densité des récepteurs hépatiques du glucagon chez les rats  
entraînés en endurance**

**« *Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats* »**

Publié dans la revue

*American Journal of Physiology : Endocrinology and Metabolism*

2001, 280, E193-E196.

Soumis le 10 juillet 2000

Accepté sous forme finale le 5 octobre 2000

### RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Les propriétés de liaison des récepteurs du glucagon ont été mesurées dans des membranes plasmiques isolées à partir de foie de rats mâles Sprague-Dawley sédentaires ( $n = 6$ ) et entraînés en endurance à la nage ( $n = 7$ ; 3 h/jour, 5 jours/semaine, pour une durée de 8 semaines). Les membranes plasmiques hépatiques ont été purifiées par un système de partition par affinité en deux phases aqueuses et la cinétique de saturation a été obtenue en incubant les membranes plasmiques (10  $\mu\text{g}$  de protéines/150  $\mu\text{l}$ ) en présence d'une concentration de  $[\text{I}^{125}]$ -glucagon comprise entre 0,15 à 3,0 nM durant 30 minutes à 30 °C. L'analyse de la courbe de saturation indique qu'il n'y a aucune différence significative au niveau de l'affinité des récepteurs du glucagon ( $K_D = 0,57 \pm 0,06$  et  $0,77 \pm 0,09$  nM pour les groupes sédentaires et entraînés respectivement), cependant la densité des récepteurs est significativement supérieure dans le foie des rats entraînés que sédentaires ( $4,28 \pm 0,19$  versus  $3,09 \pm 0,12$  pmol/mg de protéines). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon chez les sujets entraînés (Drouin et Col. *Am. J. Physiol.* 274 : E23-E28, 1998) pourrait être en partie due à une augmentation de la densité des récepteurs hépatiques du glucagon induite en réponse à l'entraînement.

**INCREASED DENSITY OF GLUCAGON RECEPTORS IN LIVER FROM  
ENDURANCE TRAINED RATS**

LÉGARÉ A<sup>2</sup>, R. DROUIN<sup>3</sup>, M. MILOT<sup>1</sup>, D. MASSICOTTE<sup>4</sup>, F. PÉRONNET<sup>3</sup>, G.  
MASSICOTTE<sup>2</sup>, AND C. LAVOIE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département des sciences de l'activité physique and <sup>2</sup>Département de chimie-biologie,  
UQTR, Trois-Rivières, P. Q., Canada G9A 5H7

<sup>3</sup>Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, P. Q., Canada H3C 3J7

<sup>4</sup>Département de kinanthropologie, UQAM, Montréal, P. Q., Canada H3C 3P8

**Running title:** Glucagon receptors and endurance training.

**Address of Correspondence:**

Carole Lavoie, Ph.D.

Département des sciences de l'activité physique

Université du Québec à Trois-Rivières

Case Postale 500, Trois-Rivières (Québec) G9A 5H7

CANADA

Tel.: (819) 376-5011 (3767)

Fax.: (819) 376-5092

Email: Carole\_Lavoie@uqtr.quebec.ca

## ABSTRACT

The binding properties of glucagon receptors were determined in plasma membranes isolated from liver of untrained ( $n = 6$ ) and swimming endurance trained Sprague-Dawley male rats ( $n = 7$ ; 3 h/day, 5 days/week, for 8 weeks). Plasma membranes were purified from liver by aqueous two-phase affinity partitioning, and saturation kinetics were obtained by incubating plasma membranes (10  $\mu\text{g}$  of proteins/150  $\mu\text{l}$ ) with [ $^{125}\text{I}$ ]-glucagon at concentrations ranging from 0.15 nM to 3.0 nM for 30 min at 30 °C. Saturating curve analysis indicated no difference in the affinity of glucagon receptors ( $K_d = 0.57 \pm 0.06$  and  $0.77 \pm 0.09$  nM in untrained and trained groups, respectively), but a significant higher glucagon receptor density in liver from untrained vs trained rats ( $3.09 \pm 0.12$  vs  $4.28 \pm 0.19$  pmol/mg of proteins). These results suggest that the reported increase in liver glucagon sensitivity in endurance trained subjects (Drouin et al. *Am. J. Physiol.* 274: E23-E28, 1998) could be partly due to an increased glucagon receptor density in response to training.

**Key words:** up-regulation, density, affinity, chronic exercise

## Introduction

Glucagon increases liver glucose production through specific membrane receptors (6, 13). Expression of glucagon receptor mRNA in hepatocytes could be modified *in vitro* by glucose (1, 4, 20, 23), cAMP (1), and oxygen (14). Bhathena et al. (3), and Dighe et al. (9) have also shown, *in vivo*, a 40 % reduction in liver glucagon receptor density in diabetic rats, and this could be due to a higher plasma glucagon level (3). A reduction in liver glucagon receptor density in diabetes could explain, in part, that under stimulation with glucagon, liver glucose production is significantly lower in type I diabetic patients than in healthy subjects (18). In contrast, Drouin et al. (10) have shown that under glucagon infusion, liver glucose production was higher in trained than in sedentary subjects. Similar observations have been made in liver from trained vs untrained rats, perfused *in situ* (0, 11, 15). These differences in liver sensitivity to glucagon associated with training in both humans and rats could result, in part, from changes in glucagon receptor properties. The purpose of the present study was, thus, to describe the effects of endurance training on liver glucagon receptor properties. Specifically, the density and affinity of glucagon receptors were determined in plasma membranes isolated from liver of rats submitted to eight weeks of swimming endurance training.

## METHODS

### *Animals and training*

The experiment was conducted on 13 male Sprague Dawley rats (Anilab inc., Ste-Foy, Québec, Canada) randomly assigned to the untrained ( $n = 6$ ) or trained group ( $n = 7$ ). Body mass at the time of sacrifice were not significantly different in trained ( $418 \pm 28$  g) and untrained rats ( $433 \pm 9$  g). The animals were kept in individual cages, at 20 °C and 55 % relative humidity with a 12-h light/12-h dark cycle, in a facility that met the Canadian Council of Animal Care guidelines. They had access to a standard rat chow, and water *ad libitum*. The protocol was approved by the Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières.

The rats were trained five days/week for eight weeks, in a 60 x 90-cm tank filled with 50-cm of water at 37 °C. The duration of each training session, which took place between 8:00 and 11:00 AM was progressively increased to reach three hours over the first two weeks. The animals assigned to the untrained group were handled daily.

### *Tissue sampling and plasma membrane purification*

The animals were anaesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg/kg i.p.) at 8:00 AM following an overnight with free access to food and water, 48 h following the last bout of exercise for the trained group. Blood (3 ml) was collected on EDTA via the abdominal

*vena cava*. The liver and *rectus femoris* from the right leg were excised. The animals were, then, sacrificed by sectioning the aorta. Following centrifugation of the blood at 3,000 x g, the plasma was removed and stored along with the *rectus femoris* at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Liver plasma membranes were prepared according to the procedure developed by Persson and Jergil (19). The liver was immediately chilled in ice-cold 0.25 M sucrose in 5 mM Tris-HCl at pH 8.0, cut into small pieces, and transferred to a Dounce homogenizer containing an aqueous two-phase system. This system was prepared to contain a final concentration of 5.7 % (w/w) Dextran T-500 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), 5.7 % (w/w) polyethylene glycol 3350 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 0.15 mM Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  at pH 7.8 and about 2.00 g of liver for a total weight of 15 g. The system was homogenized before being centrifuged at low speed (150 x g) during 5 min. The top phase was collected, and the bottom phase was re-extracted a second time after homogenization with an equal volume of fresh top phase. The combined top phases were added to a new bottom phase prepared by pre-equilibration of a 10-g two-phase system containing 6 % (w/w) Dextran T-500, and 6 % (w/w) polyethylene glycol 3350, in 20 mM Tris- $\text{H}_3\text{BO}_3$  at pH 7.8. This system also contained 50 mg dextran-bound wheat-germ agglutinin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) for affinity partitioning. After homogenization, the phases were separated by centrifugation (150 x g for 5 min). The top phases were discarded, the bottom phase was re-extracted twice with fresh top phase, and the combined bottom phases were diluted 10-fold in 0.25 M sucrose and 0.1 M N-acetylglucosamine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) in 5 mM Tris-HCl at pH 8.0. The membranes were pelleted by ultracentrifugation for 60 min at 100,000 x g, and resuspended in 50 mM



HEPES buffer at pH 7.6. The entire purification procedure was performed at 4 °C. The recovery of plasma membrane, assessed by the membrane marker 5' nucleotidase (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), averaged  $63.5 \pm 7.0$  %. The protein content in pellets used for the binding assay was determined by the method of Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratory, Mississauga, Ontario, Canada).

#### *Binding assay*

The receptor-binding assay used is a modification of the technique described by Frandsen and co-workers (12). Purified membranes (10 µg proteins/150 µl), in triplicate, were incubated with [ $^{125}$ I]-glucagon (NEN® Life Science Products, Inc. Boston, MA) at concentrations ranging from 0.15 to 3.00 nM in HEPES buffer (50 mM, pH 7.6) containing 1 % human serum albumin (HSA) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Incubations were carried out at 30 °C for 30 min in a total volume of 150 µl. Aliquots of 100 µl were added to microfuge tubes containing 200 µl of cold (4 °C) 2.5 % HSA in HEPES buffer (50 mM, pH 7.6). Free and membrane-bound [ $^{125}$ I]-glucagon were separated by centrifugation at 10,000 x *g* for 5 min, and the supernatant was discarded. The membrane pellet was washed once with cold 200 µl HEPES buffer containing 2.5 % HSA, and the membrane-bound radioactivity was determined (Gamma counter, Wallac 1470 Wizard, Wellesley, MA). The non-specific binding was measured in presence of  $3 \times 10^{-6}$  M glucagon (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). In the present study, based on preliminary experiments, an incubation time of 30 min with membrane protein concentration of 10 µg/150 µl was selected to ensure saturation kinetic sensitivity. The

maximal density (B<sub>max</sub>) and the apparent affinity (K<sub>d</sub>) of glucagon receptors were obtained through rectangular hyperbolic regression of the specific binding curve (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

### *Analysis*

Plasma insulin (Medicorp, Montréal, Québec, Canada) and glucagon (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Ca, USA) concentrations were measured by radioimmunoassays using commercially available kits. The activity of citrate synthase was determined in the *rectus femoris*, according to the method suggested by Srere (22).

### *Statistics*

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Comparisons were made using Student t-tests and significance was set at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

As shown in table 1, citrate synthase activity in *rectus femoris* was significantly 27 % higher in trained than in untrained rats, while plasma insulin concentration was significantly 17 % lower. In contrast, no significant change was observed for plasma glucagon concentration.

The amount of [<sup>125</sup>I]-glucagon bound to purified liver plasma membranes plateaued with glucagon concentrations ranging between 1.5 and 3.0 nM in both groups. A significant larger binding was observed in trained rats ( $0.21 \pm 0.2$  vs  $0.16 \pm 0.2$  nM in untrained rats) (Figure 1). Scatchard plot of saturation curves for plasma membranes purified from liver of trained and untrained rats are shown in figure 2. The affinity ( $K_d$ ) of glucagon receptors for the ligand was similar in liver plasma membranes for both groups, but receptor density ( $B_{max}$ ) was higher in liver plasma membranes from trained than untrained rats (Figure 2 and table 1).

## DISCUSSION

Drouin et al. (10) have shown that endurance training was associated with an increased liver glucose production in response to glucagon infusion in humans. In their study, sedentary and endurance-trained subjects were studied at rest. When endogenous insulin and glucagon secretions were suppressed by somatostatin, and replaced in order to achieve similar physiologic concentrations in both groups, liver glucose production was 53 % higher in trained vs untrained subjects ( $15.8 \pm 2.8$  vs  $7.4 \pm 1.6$  mol  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, respectively). Preliminary data from our laboratory (11, 15), as well as from Cheeks et al. (0), using *in situ* liver perfusion, indicate that glycogenolysis as well as gluconeogenesis upon glucagon stimulation are both significantly higher in liver from endurance-trained rats.

Results from the present experiment are in line with these observations in both animals and man, and suggest that the increased liver sensitivity to glucagon associated with training could be due, at least in part, to an increased glucagon receptor density in liver. Indeed, eight weeks of swimming endurance training in rats, increased by about 28 % the density of glucagon receptors measured using a radiolabeled binding assay in plasma membranes from the liver, with no change in the affinity of the receptors. The density and affinity of glucagon receptors measured in purified liver plasma membranes from untrained rats ( $3.09 \pm 0.12$  pmol/mg of proteins and  $0.57 \pm 0.06$  nM, respectively) were within the range of

values previously reported: 1.8 to 3 pmol/mg of proteins, and 0.1 to 1.2 nM, respectively (8, 16, 21). In purified liver plasma membranes from trained rats, the affinity of glucagon receptors was in the same range ( $0.77 \pm 0.09$  nM), but their density was much higher ( $4.28 \pm 0.19$  pmol/mg of proteins).

The only direct evidences of changes in properties of liver glucagon receptors, is a reduction in density reported in streptozotocin-induced diabetes in rats (-40 % over five days) (3, 9) and in healthy rats following acute (-20 % within 5-60 min following a single bolus) (2) or chronic glucagon administration (-33 % over seven days) (3). The reduction in liver glucagon receptor density in diabetes, could be responsible for the lower glucagon sensitivity shown by Ørskov et al. (18) in type I diabetic subjects, and could explained, in part, the defective counter-regulatory mechanisms to hypoglycemia observed in diabetic patients (7, 18, 24). As for the effect of exercise, the only indirect evidence suggesting that exercise training could increase glucagon receptor density and/or affinity in the liver, is a study by Nieto and co-workers (17). In this experiment, the increase in adenylyl cyclase activity over a wide range of glucagon concentrations was higher in purified liver plasma membranes from endurance trained than from untrained rats.

Results from the present experiment extend the observations by Authier et al. (2), Bhathena et al. (3), and Dighe et al. (9), and indicate that in addition to streptozotocin-induced diabetes, and glucagon administration, training also modifies the binding characteristics of liver glucagon receptors. However, the mechanisms by which the density of glucagon receptors in the liver could be modified in various situations, remain poorly understood.

The expression of glucagon receptor mRNA, *in vitro*, has been shown to increase when oxygen (14) and glucose concentrations (1, 4, 20, 23) increase and decreases when cAMP concentration increases (1). Data from Authier et al. (2), and Bhathena et al. (3) also indicate that glucagon can downregulate the density of its receptors, both quickly (5-60 minutes following a single bolus) and chronically (24 hours after seven days of b.i.d. glucagon injection). These and others factors could be modified following chronic regular swimming exercise. It remains, however, difficult, at the present time, to speculate on the mechanisms by which eight weeks of swimming endurance training increased the density of liver glucagon receptors in rats.

**Acknowledgements**

This work was supported the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Government of Québec, the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Government of Canada, the Association Diabète Québec: Summer stipend to A. Légaré. Special thanks for their technical assistance to Mrs. Rollande Caron, director of the Animal Care Facility and Mrs. Geneviève Robert.

## REFERENCES

1. **Abrahamsen, N., K. Lundgren and E. Nishimura.** Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J. Biol. Chem.* 270: 15853-15857, 1995.
2. **Authier, F., B. Desbuquois and B. De Galle.** Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver. *Endocrinology* 131: 447-457, 1992.
3. **Bhathena, S.J., N.R. Voyles, S. Smith and L. Recant.** Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J. Clin. Invest.* 61:1488-1497, 1978.
4. **Burcelin, R., C. Mrejen, J.F. Decaux, S.H. De Mouzon, J. Girard and M.J. Charron.** *In vivo* and *in vitro* regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 273: 8088-8093, 1998.
5. **Cheeks, A.M., A.H. Hevener and C.M. Donovan.** Enhanced hepatic gluconeogenic response to elevations in glucagon with endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28: S58 # 347, 1996 (Abstract).
6. **Chhiber, V.L., C. Soriano and J.A. Tayek.** Effects of low-dose and high-dose glucagon on glucose production and gluconeogenesis in humans. *Metabolism* 49: 39-46, 2000.
7. **Cryer PE.** Hypoglycemia is the limiting factor in the management of diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 15 : 42-46, 1999.



8. **Desbuquois, B. and F. Authier.** Récepteur du glucagon. *Annales d'endocrinologie* (Paris) 50: 440-446, 1989.
9. **Dighe, R.R., F.J. Rojas, L. Birnbaumer and A.J. Garber.** Glucagon-stimulable adenylyl cyclase in rat liver: The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 73: 1013-1023, 1984.
10. **Drouin, R., C. Lavoie, J. Bourque, F. Ducros, D. Poisson and J.-L. Chiasson.** Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am. J. Physiol.* 274: E23-E28, 1998.
11. **Drouin, R., M. Milot, G. Robert, D. Massicotte, F. Péronnet and C. Lavoie.** Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: Effect mediated by increased glycogenolysis. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: S224 #1061, 2000 (Abstract).
12. **Frandsen, E.K., L. Thim, A.J. Moody and J. Markussen.** Structure-function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21). *J. Biol. Chem.* 260: 7581-7584, 1985.
13. **Ikezawa, Y., K. Yamatani, A. Ogawa, H. Ohnuma, M. Igarashi, M. Daimon, H. Manaka and H. Sasaki.** Effects of glucagon on glycogenolysis and gluconeogenesis are region-specific in periportal and perivenous hepatocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 132: 547-555, 1998.
14. **Krones, A., T. Kietzmann and K. Jungermann.** Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett.* 421: 136-140, 1998.

15. **Lavoie, C., R. Drouin, M. Milot, G. Robert, D. Massicotte and F. Péronnet.** Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: Effect mediated by increased gluconeogenesis. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: S24 # 1062, 2000 (Abstract).
16. **Lipson, K.E., A.A. Kolhatkar, R.G. Maki and D.B. Donner.** Divalent cations regulate glucagon binding. Evidence for actions on receptor-Ns complexes and on receptors uncoupled from Ns. *Biochemistry* 27: 1111-1116, 1988.
17. **Nieto, J.L., I. Diaz-Laviada, A. Guillen, and A. Haro.** Effect of endurance physical training on rat liver adenylyl cyclase system. *Cell. Signal.* 8: 317-322, 1996.
18. **Ørskov, L., K.G. Alberti, A. Mengel, N. Moller, O. Pedersen, O. Rasmussen, T. Seefeldt and O. Schmitz.** Decreased hepatic glucagon responses in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34: 521-526, 1991.
19. **Persson, A and B. Jergil.** Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning. *Anal. Biochem.* 204: 131-136, 1992.
20. **Portois, L., B. Maget, M. Tastenoy, J. Perret and M. Svoboda.** Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J. Biol. Chem.* 274:8181-8190, 1999.
21. **Rojas, F.J. and L. Birnhaumer.** Regulation of glucagon receptor binding: Lack of effect of Mg and preferential role for GDP. *J. Biol. Chem.* 260: 7829-7835, 1985.
22. **Srere, P.A.** Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13: 3-5, 1969.
23. **Svoboda, M., L. Portois and W.J. Malaisse.** Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene. *Mol. Genet. Metab.* 68:258-267, 1999.

24. **Vranic, M., P. Miles , K. Rastogi, K. Yamatani, Z. Shi, L. Lickley and G. Jr. Hetenyi.** Effect of stress on glucoregulation in physiology and diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.*:291:161-183, 1991.

Figure legends:

Figure 1: Saturation curves with increasing concentrations of [ $^{125}$ I]-glucagon for purified plasma membranes from untrained (n = 6) and trained (n = 7) rat liver (mean  $\pm$  SE).

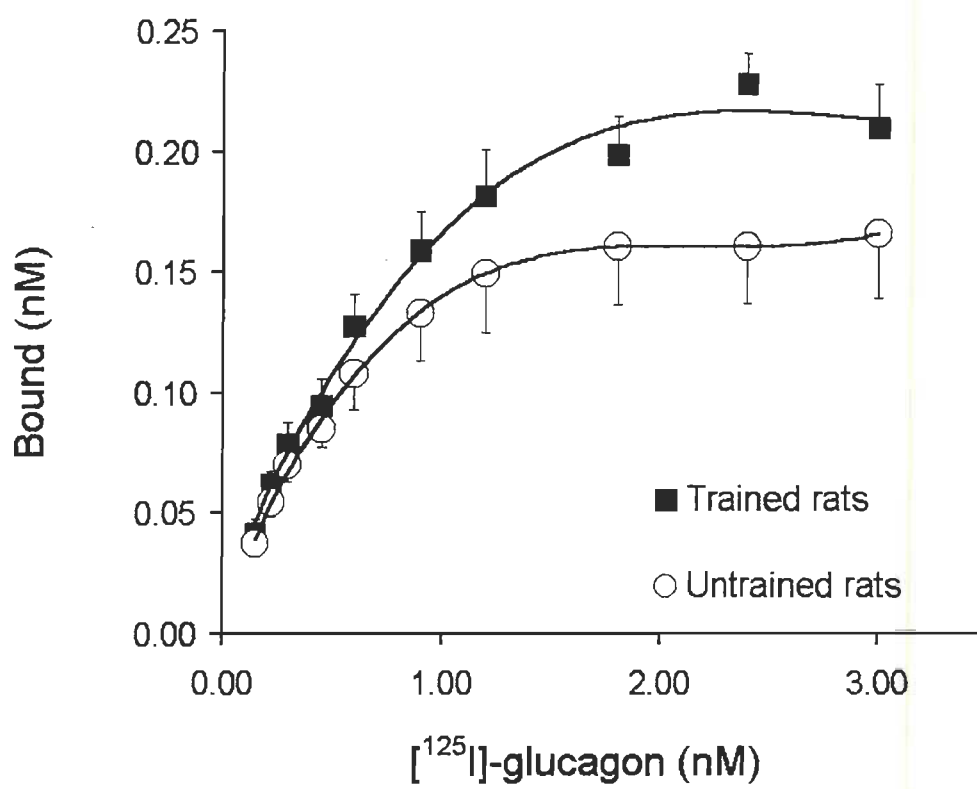
Figure 2: Scatchard plot of the binding of [ $^{125}$ I]-glucagon to purified plasma membranes from untrained (n = 6) and trained (n = 7) rat liver (mean  $\pm$  SE).

Table 1. Citrate synthase activity, plasma insulin and glucagon concentrations, and properties of liver glucagon receptors from untrained (n = 6) and trained (n = 7) animals.

	Untrained	Trained
CS activity in <i>rectus femoris</i> ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	20.7 $\pm$ 2.5	27.9 $\pm$ 1.6 *
Plasma insulin (pmol/L)	326.9 $\pm$ 13.0	271.4 $\pm$ 24.0 *
Plasma glucagon (nmol/L)	33.5 $\pm$ 2.7	30.6 $\pm$ 1.2
Bmax (pmol/mg of proteins)	3.09 $\pm$ 0.12	4.28 $\pm$ 0.19 *
K <sub>D</sub> (nM)	0.57 $\pm$ 0.06	0.77 $\pm$ 0.09

Values are means  $\pm$  SE. \* Significantly different from untrained rats ( $P < 0.05$ ).

Figure 1



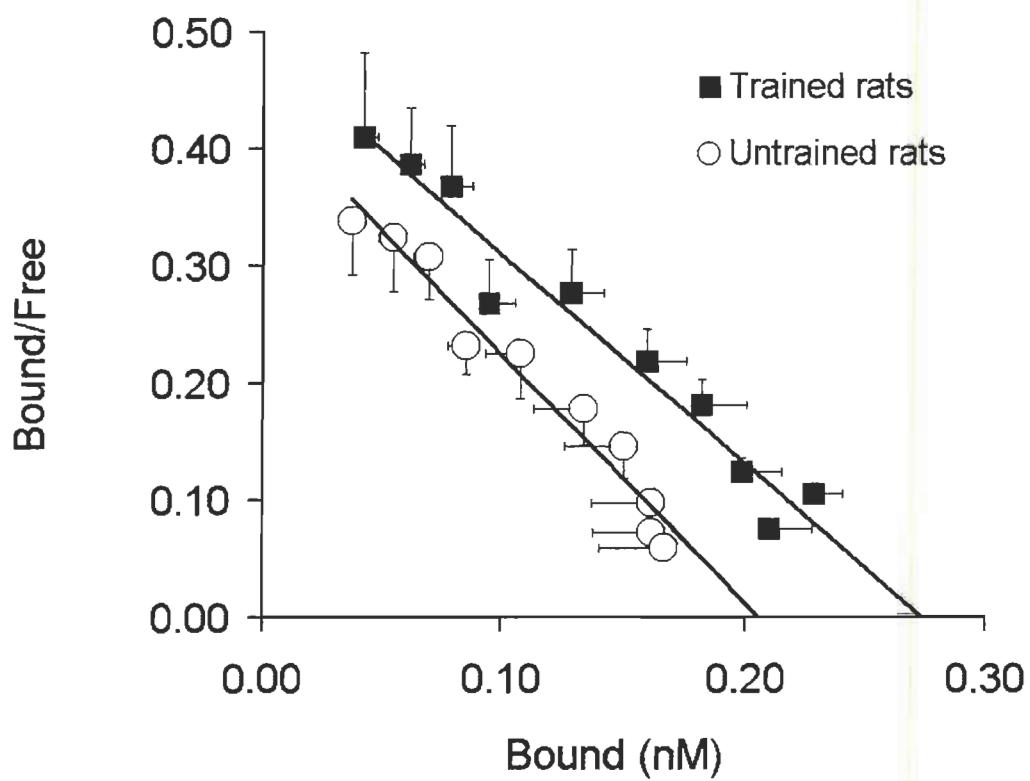
**Figure 2:**

Tableau 4. Activité de la citrate synthétase, concentration plasmatique d'insuline et de glucagon, et propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon des animaux sédentaires (n = 6) et entraînés (n = 7).

	Sédentaire	Entraîné
CS activité dans le <i>rectus</i>		
<i>femoris</i>	20,7 ± 2,5	27,9 ± 1,6 *
( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )		
Insuline plasmatique	326,9 ± 13,0	271,4 ± 24,0 *
(pmol/L)		
Glucagon plasmatique	33,5 ± 2,7	30,6 ± 1,2
(nmol/L)		
B <sub>max</sub>	3,09 ± 0,12	4,28 ± 0,19 *
(pmol/mg de protéines)		
K <sub>D</sub>	0,57 ± 0,06	0,7 ± 0,09
(nM)		

Les valeurs sont les moyennes ± l'erreur standard de la moyenne. \* Significativement différent des rats sédentaires ( $P < 0.05$ ).



Figure 7. Courbe de saturation des récepteurs hépatiques du glucagon. Incubation des membranes plasmiques purifiées des rats sédentaires (untrained) ( $n = 6$ ) et entraînés (trained) ( $n = 7$ ) en présence d'une concentration croissante de [ $^{125}$ I]-glucagon (moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne).

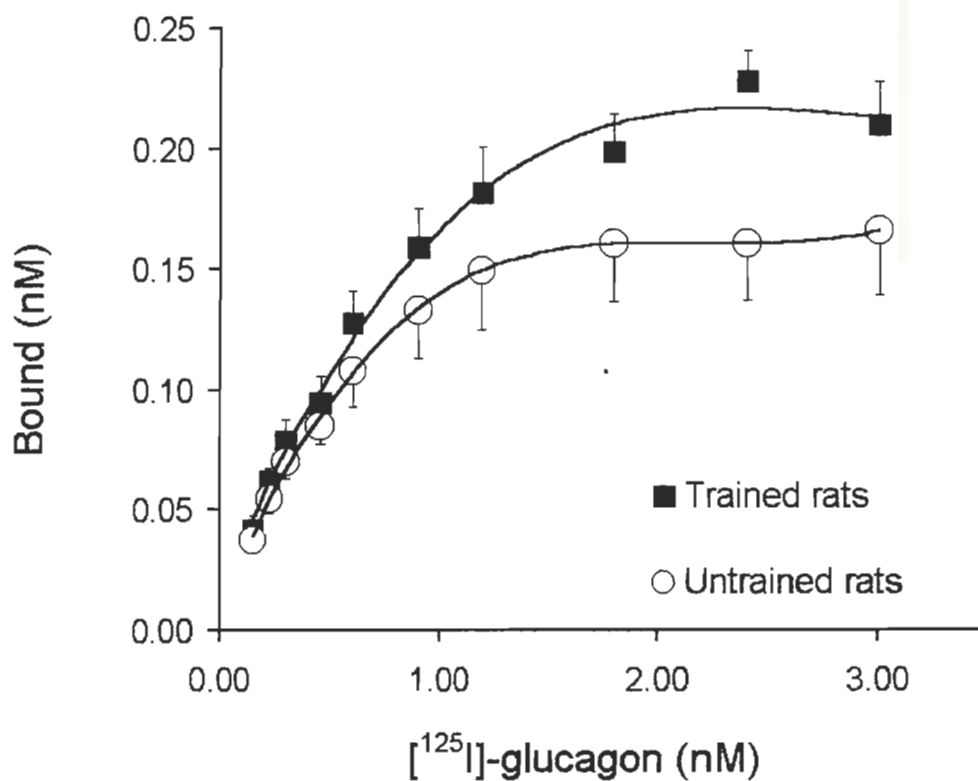
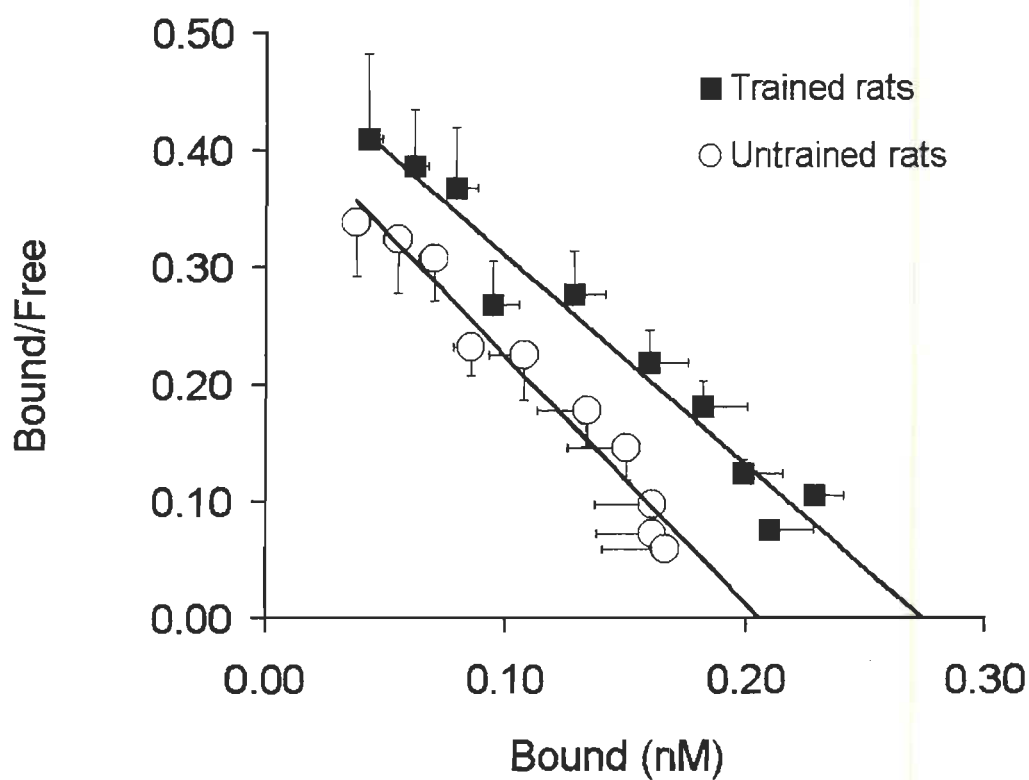


Figure 8 : Représentation graphique de type Scatchard de la liaison du [ $^{125}$ I]-glucagon au membranes plasmiques purifiées des foies de rats sédentaires (untrained) (n = 6) et entraînés (trained) (n = 7) (moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne).



## **CHAPITRE 3**

### **DISCUSSION**

Les objectifs principaux de ce projet de maîtrise consistaient à la mise au point des techniques nécessaires aux mesures d'affinité et de densité des récepteurs afin de déterminer l'impact d'un entraînement à la nage d'une durée de huit (8) semaines sur les propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon.

Le présent travail de maîtrise a été concrétisé par la publication des résultats des mesures des propriétés des récepteurs du glucagon (chapitre 2) et a nécessité, dans un premier temps, la mise au point des techniques inhérentes à sa réalisation. Les résultats de l'application des deux techniques : purification des membranes plasmiques de foie par partition par affinité et radioliation des récepteurs hépatiques du glucagon, se retrouvent dans cette section. Ils y ont été placés du fait qu'ils n'apparaissent pas dans l'article publié et compte tenu du temps accordé pendant ma formation et de leur importance à l'accomplissement du présent travail.

#### **3.1 Techniques employées**

Les membranes plasmiques hépatiques de rats contenant les récepteurs du glucagon ont été purifiées par la technique de purification en deux phases aqueuses avec partition par

affinité (Persson et Jergil 1992). La récupération des membranes plasmiques au cours de la procédure de purification a été assurée par le dosage d'un marqueur enzymatique, la 5'-nucléotidase à une valeur de  $63,5 \pm 7,0$  %. La technique de radioliation du glucagon aux récepteurs contenus dans les membranes plasmiques a été adaptée de Frandsen et col. (1985). Afin de s'assurer de la validité de l'épreuve de radioliation, trois critères ont dû être respectés : temps d'incubation approprié, quantité de membranes plasmiques nécessaires à la certification de la sensibilité de détection et saturabilité des récepteurs hépatiques du glucagon. Le temps d'incubation a été déterminé lorsque la saturation du récepteur a été atteinte en présence de la plus faible concentration de glucagon utilisée (tableau 5). Cette étape est essentielle, car plus la concentration de ligand est faible, plus le temps d'incubation nécessaire pour obtenir un état d'équilibre est long (Limbird et Motulsky 1998). L'état d'équilibre se réfère à la stabilité du rapport entre la quantité de glucagon radioactif lié et non-lié et correspond à la saturation du récepteur (Limbird et Motulsky 1998). Suite à la détermination du temps d'incubation, une épreuve de radioliation a été effectuée en présence d'une concentration croissante de membranes plasmiques de foie. La concentration de protéines choisie était comprise dans la pente de la courbe de saturation et tenait compte de la quantité de matériel biologique disponible (figure 9 et Tableau 6). Ceci permettait de s'assurer de la détection d'une variation positive ou négative de la liaison du glucagon à son récepteur. De plus, les courbes de saturation de la figure 7 (chapitre 2) montrent que les récepteurs hépatiques du glucagon sont saturables. Cette saturation est non modifiée par l'entraînement en endurance (chapitre 2, figure 7). Dans les deux cas, la saturation se produit lorsque la concentration de glucagon radioactif se situe entre 1,5 et 3,0 nM.

Figure 9. Épreuve fonctionnelle de liaison du  $I^{125}$ -glucagon [0,15 nM] en fonction de la concentration de protéines de membranes plasmiques hépatiques.

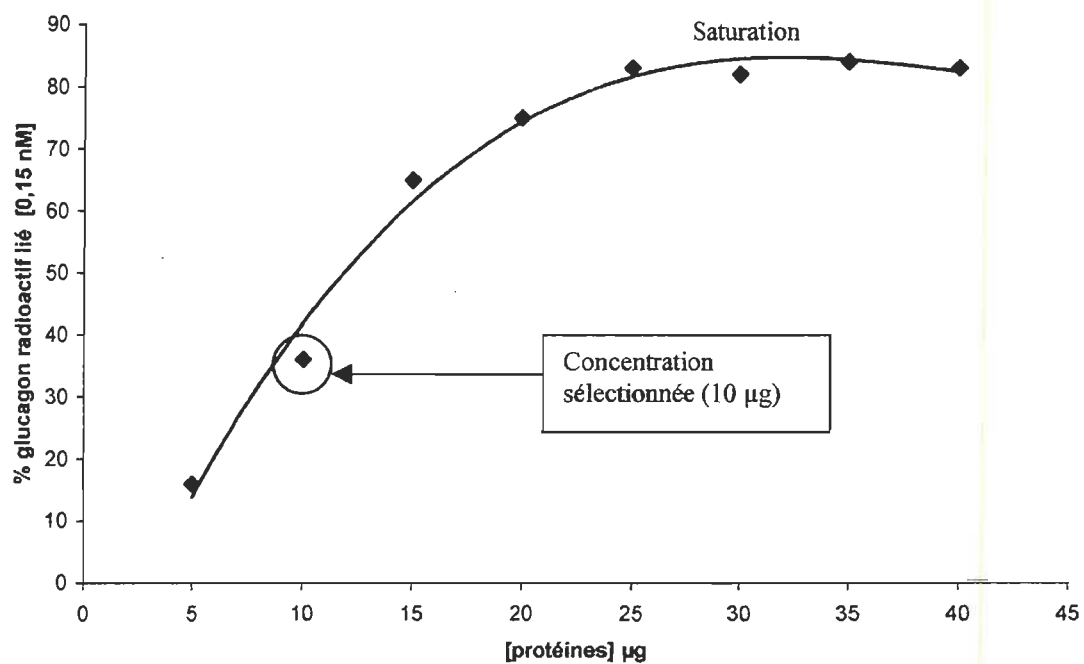


Tableau 5. Épreuve fonctionnelle de liaison du  $I^{125}$ -glucagon (0,15 nM) avec des membranes plasmiques hépatiques en fonction du temps d'incubation.

Temps d'incubation (min.)	% Lié
5	60
10	72
15	78
20	96
→ 30	100

Tableau 6. Épreuve fonctionnelle de liaison du  $I^{125}$ -glucagon (0,15 nM) en fonction de la concentration en  $\mu\text{g}$  de protéines de membranes plasmiques hépatiques.

[protéines] $\mu\text{g}$	% Lié
5	16
→ 10	36
15	65
20	75
25	83

### **3.2 Résultats**

Les résultats obtenus lors de la présente étude démontrent que huit (8) semaines d'entraînement en endurance accroissent de 28 % la densité des récepteurs hépatiques du glucagon sans toutefois altérer son affinité.

L'analyse graphique (GraphPad) a révélé la présence d'un seul site de liaison de haute affinité dans chacun des groupes d'animaux. Pour les animaux sédentaires, les données de densité ( $3,09 \pm 0,12$  pmol/mg de protéines) et d'affinité ( $0,57 \pm 0,06$  nM) des récepteurs hépatiques du glucagon que nous avons obtenues en utilisant les épreuves fonctionnelles de radiolisations sont conformes à la littérature (Desbuquois et Authier 1989; Lipson et col. 1988; Rojas et Birnhaumer 1985). Ainsi, les valeurs de densité et d'affinité retrouvées dans la littérature sont respectivement comprises entre 1,8 à 3,0 pmol/mg de protéines et 0,1 à 1,2 nM, et englobent donc les valeurs de nos rats sédentaires. De plus, la valeur d'affinité de notre groupe entraîné ( $0,77 \pm 0,09$  nM) se retrouve comprise dans ces mêmes valeurs. Seule la valeur de la densité ( $4,28 \pm 0,19$  pmol/mg de protéines) des récepteurs hépatiques du glucagon est significativement supérieure aux valeurs des animaux contrôles.

### **3.3 Études antérieures**

La régulation du nombre de récepteurs exprimés à la surface des membranes plasmiques des cellules est un mécanisme par lequel la sensibilité à une hormone peut-être

contrôlée (Abrahamsen et col. 1995). Récemment, une augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon a été associée à l'entraînement en endurance (Drouin et col. 1998). De ce fait, il a été démontré par Drouin et collaborateurs (1998) que l'entraînement en endurance augmentait la production hépatique de glucose en réponse à une même stimulation, au repos, par infusion de glucagon chez l'Homme. Les résultats mesurés par traçage isotopique ont révélés une production hépatique de glucose de 53 % supérieure chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires ( $15,8 \pm 2,8$  versus  $7,4 \pm 1,6 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivement). De plus, des données obtenues par notre laboratoire (Drouin et col. 2000; Lavoie et col. 2000) ainsi que par Cheeks et collaborateurs (1996) lors de perfusion de foie *in situ* montrent que la production hépatique de glucose est significativement plus élevée lors d'une stimulation par le glucagon chez les rats entraînés comparativement aux rats sédentaires. Par conséquent, les résultats obtenus dans la présente étude s'avèrent en relation directe avec les études effectuées chez l'Homme (Drouin et col. 1998) et chez l'animal (Cheeks et col. 1996; Drouin et col. 2000; Lavoie et col. 2000) et suggèrent qu'une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon induite par l'entraînement en endurance puisse être due, du moins en partie, à une augmentation de la densité des récepteurs hépatiques du glucagon.

### **3.4 Régulateurs potentiels**

Depuis quelques années, les chercheurs commencent à peine à réaliser l'importance du rôle du glucagon à l'exercice (Wasserman et col. 1984, 1988, 1989; Lavoie et col. 1997). Il est donc prématuré, à ce stade-ci, de pouvoir expliquer la régulation des



récepteurs hépatiques du glucagon par l'entraînement en endurance. De plus, il n'existe aucune information dans la littérature actuelle concernant les effets de l'exercice à court ou à long terme sur les propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon. Par conséquent, la présente étude est la première à caractériser l'impact de l'exercice à long terme sur les récepteurs hépatiques du glucagon. La seule évidence indirecte suggérant que l'entraînement puisse augmenter la densité et/ou l'affinité des récepteurs du glucagon au niveau du foie est l'étude effectuée par Nieto et ses collaborateurs (1996). Dans cette étude, l'augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase dans des préparations de membranes plasmiques de foie lors d'une incubation en présence d'une concentration de glucagon de  $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  M était significativement supérieure chez les rats entraînés en endurance comparativement aux rats sédentaires. Cette augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase dans le foie pourrait être expliquée par l'augmentation de la densité des récepteurs hépatiques du glucagon observée dans la présente étude.

Dans la littérature, peu d'études ont démontré que les récepteurs du glucagon subissaient une régulation négative tel qu'illustré dans le tableau 2 (chapitre 1) (Bhathena et col. 1978; Digue et col. 1984). Une réduction de 40 % des récepteurs du glucagon a été démontrée chez des rats dont le diabète de type 1 avait été induit par l'injection de streptozotocine. La réduction de la densité des récepteurs dans le foie pourrait être responsable de la baisse de la sensibilité au glucagon démontrée par Ørskov et collaborateurs (1991) chez les sujets atteints de diabète de type 1. Ces résultats fragmentaires pourraient expliquer, du moins en partie, les mécanismes défectueux de

contre-régulation à l'hypoglycémie observés chez les patients diabétiques (Cryer 1999; Nonogaki 2000; Vranic et col. 1991).

Les données provenant des travaux d'Abrahamsen et col. (1995), Burcelin et col. (1998) et Krones et col. (1998) indiquent que le glucose, l'AMP cyclique ainsi que l'oxygène modifient l'expression de l'ARN messenger du récepteur du glucagon *in vitro*. Puisque ces études ont été effectuées *in vitro* et que les régulateurs identifiés n'ont pas été étudiés *in vivo* en relation avec l'entraînement en endurance ni avec les propriétés des récepteurs du glucagon, il est prématuré d'émettre une hypothèse concernant leurs implications dans les mécanismes régulateurs de ce récepteur. Néanmoins, si l'effet du glucose qui a été décrit dans l'étude de Burcelin et collaborateurs (1998) est considéré comme régulateur potentiel, une variation du flux de glucose bien plus qu'une augmentation du glucose sanguin pourrait s'avérer responsable d'une régulation positive du récepteur du glucagon. De plus, nous savons, grâce à l'étude de Portois et ses collaborateurs (1999) et Svoboda et collaborateurs (1999), que le gène du récepteur du glucagon possède un élément réponse au glucose dans son promoteur. Ainsi, en s'appuyant sur les résultats des études de Burcelin et col. (1998) et Portois et col. (1999), les trioses phosphate intermédiaires (Dihydroxyacétone phosphate, glyceraldéhyde 3-phosphate, 1,3 biphosphoglycérate, 3-phosphoglycérate, 2-phosphoglycérate, phosphoénolpyruvate) du métabolisme du glucose pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de l'ARN messenger du récepteur hépatique du glucagon. Encore aujourd'hui, l'effet de l'exercice sur les trioses phosphate demeure à élucider. En ce qui concerne l'entraînement en endurance, il est bien connu qu'il provoque une augmentation de la production hépatique

de glucose lorsque stimulée à l'exercice ou par le glucagon comparativement aux sujets sédentaires (Brooks et col. 1983; Coggan et col. 1995; Drouin et col. 1998). Il est donc possible d'envisager que le glucose et/ou des métabolites intermédiaires de la néoglucogenèse et/ou de la glycogénolyse puissent être des régulateurs importants impliqués dans la traduction de l'effet de l'entraînement en endurance sur les récepteurs du glucagon.

Pour ce qui concerne les études effectuées *in vivo*, les résultats présentés par Bhathena et ses collègues (1978) suggèrent que la réduction de la densité des récepteurs hépatiques du glucagon chez les rats diabétiques puisse être causée par une augmentation de la concentration plasmatique de glucagon (+62 % chez les rats diabétiques comparativement aux rats contrôles). De plus, lorsque du glucagon est injecté chez des rats sains, deux fois par jour, durant une période de sept jours, une réduction significative de 33 % de la densité des récepteurs du glucagon est observée. Toujours en ce qui concerne les injections de glucagon, Authier et collaborateurs (1992) ont obtenu une réduction significative de la densité des récepteurs hépatiques du glucagon de l'ordre de 20 % durant les 5 à 60 premières minutes suivant une injection unique de 6 mmol/200 g de poids. Les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'adaptation lors de l'entraînement en endurance et qui résultent en un accroissement du nombre des récepteurs du glucagon pourraient être causés par une plus faible concentration de glucagon. Ainsi, même si la diminution de la concentration de glucagon (- 8,1 %) rapportée dans la présente étude n'est pas statistiquement significative, une implication physiologique ne peut pas, pour l'instant, être mise de côté. Ce mécanisme et/ou d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans

l'accroissement de la densité des récepteurs hépatiques observés dans les préparations purifiées de membranes plasmiques de foie provenant des rats entraînés en endurance. Cependant, les mécanismes exacts restent encore à être identifiés.

### **3.5 Perspectives de recherche**

Suite à la caractérisation de l'impact d'un entraînement en endurance sur les propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon, les perspectives de recherche se divisent en cinq voies principales. La première consistera à identifier les mécanismes responsables de la régulation positive des récepteurs hépatiques du glucagon induite par l'entraînement en endurance. Une des pistes résidera donc à l'identification des intermédiaires communs à la néoglucogenèse/glycolyse impliqués dans le métabolisme du glucose. La deuxième voie permettra de déterminer, à l'aide de l'immunobuvardage de type Western, si l'augmentation de la densité du récepteur hépatique du glucagon est la résultante d'une translocation ou d'une augmentation de la quantité de protéine. La troisième voie apportera des informations, en utilisant la technique d'immunobuvardage de type Northern, quant à l'impact de l'entraînement en endurance sur l'expression du gène codant pour le récepteur du glucagon. La quatrième voie consistera à déterminer les effets d'un exercice aigu sur les récepteurs hépatiques du glucagon. La cinquième voie résidera à la détermination de l'impact d'un entraînement en endurance sur les récepteurs hépatiques du glucagon de rats atteint d'un diabète de type 1. Comme il a été fait mention dans la section 3.4 du présent chapitre, il a été observé chez des patients atteints d'un diabète de type 1, une diminution au fil des ans de la sensibilité hépatique au glucagon (Ørskov et col. 1991) à laquelle s'ajoute

d'autres mécanismes défectueux de contre-régulation à l'hypoglycémie (Cryer 1999; Nonogaki et col. 2000; Vranic et col. 1991). Si la diminution, dans le diabète de type 1, du nombre de récepteurs hépatiques du glucagon peut être une des causes de la réduction de la sensibilité hépatique au glucagon, est-il possible que l'entraînement en endurance puisse restaurer la perte de sensibilité hépatique au glucagon par l'augmentation des récepteurs ? Par conséquent, les résultats obtenus lors de la présente étude laissent entrevoir des perspectives intéressantes qui sont déjà à l'étude à notre laboratoire.

### **3.6 Conclusion**

L'entraînement en endurance, chez les animaux sains, augmente significativement de 28% la densité des récepteurs hépatiques du glucagon, sans toutefois modifier l'affinité. Ces résultats indiquent que l'augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon induite par l'entraînement en endurance peut s'expliquer, en partie, par des modifications de la densité des récepteurs du glucagon.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abrahamsen, N., & Nishimura, E. Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids. *Endocrinology*, 1995, *136*, 1572-1578.
- Abrahamsen, N., Lundgren, K., & Nishimura, E. Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270*, 15853-15857.
- Authier, F., Desbuquois, B., & De Galle, B. Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver. *Endocrinology*, 1992, *131*, 447-457.
- Bhathena, S.J., Voyles, N.R, Smith, S., & Recant, L. Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J. Clin. Invest.*, 1978, *61*, 1488-1497.
- Brooks, G.A., & Donovan, C.M. Effects of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am. J. Physiol.*, 1983, *244*, E505-E512.
- Burcelin, R., Mrejen, C., Decaux, J.F., De Mouzon, S.H., Girard, J., & Charron, M.J. *In vivo* and *in vitro* regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 8088-8093.

- Cheeks, A.M., Hevener, A.H., & Donovan, C.M. Enhanced hepatic gluconeogenic response to elevations in glucagon with endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 1996, 28, S58 # 347, (Résumé).
- Coggan, A.R., Swanson, S.C., Mendenhall, L.A., Habash, D.L., & Kien, C.L. Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am. J. Physiol.*, 1995, 268, E375-E383.
- Cryer, P.E. Hypoglycemia is the limiting factor in the management of diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 1999, 15, 42-46.
- Desbuquois, B. & Authier, F. Récepteur du glucagon. *Ann. Endo. (Paris)*, 1989, 50, 440-446.
- Dighe, R.R., Rojas, F.J., Birnbaumer, L., & Garber, A.J. Glucagon-stimulable adenylyl cyclase in rat liver: The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 1984, 73, 1013-1023.
- Drouin, R., Lavoie, C., Bourque, J. Ducros, F., Poisson, D., & Chiasson, J.-L. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am. J. Physiol.*, 1998, 274, E23-E28.
- Drouin, R., Milot, M., Robert, G., Massicotte, D., Péronnet, F., & Lavoie, C. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: Effect mediated by increased glycogenolysis. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2000, 32, S224 #1061 (Résumé).
- Frandsen, E.K., Thim, L., Moody, A.J., & Markussen, J. Structure-function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21). *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 7581-7584.



- Krones, A., Kietzmann, T., & Jungermann, K. Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett.*, 1998, 421 (2), 136-140.
- Lavoie, C., Drouin, R., Milot, M., Robert, G., Massicotte, D., & Péronnet, F. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: Effect mediated by increased gluconeogenesis. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2000, 32, S24 # 1062 (Résumé).
- Lavoie, C., Ducros, F., Bourque, J., Langelier, H., & Chiasson, J.L. Glucose metabolism during exercise in man : the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, 75, 26-35.
- Limbird, L.E., & Motulsky, H. The endocrine system : Receptor identification and characterization, Conn P. Michael editor, 1998, 7, 49-66.
- Lipson, K.E., Kolhatkar, A.A., Maki, R.G., & Donner, D.B.. Divalent cations regulate glucagon binding. Evidence for actions on receptor-Ns complexes and on receptors uncoupled from Ns. *Biochemistry*, 1988, 27, 1111-1116.
- Nieto, J.L., Diaz-Laviada, I., Guillen, A., & Haro, A. Effect of endurance physical training on rat liver adenylyl cyclase system. *Cell. Signal.*, 1996, 8, 317-322.
- Nonogaki, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, 2000, 43 (5), 533-549.
- Ørskov, L., Alberti, K.G., Mengel, A., Moller, N., Pedersen, O., Rasmussen, O., Seefeldt, T., & Schmitz, O. Decreased hepatic glucagon responses in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1991, 34, 521-526.

- Persson, A., & Jergil, B. Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning. *Anal. Biochem.*, 1992, 204, 131-136.
- Portois, L., Maget, B., Tastenoy, M., Perret, J. & Svoboda, M. Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 8181-8190.
- Rojas, F.J., & Birnhaumer, L. Regulation of glucagon receptor binding: Lack of effect of Mg and preferential role for GDP. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 7829-7835.
- Svoboda, M., Portois, L., & Malaisse, W.J. Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1999, 68, 258-267.
- Vranic, M., Miles, P., Rastogi, K., Yamatani, K., Shi, Z., Lickley, L., & Hetenyi, G. Jr. Effect of stress on glucoregulation in physiology and diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1991, 291, 161-183.
- Wasserman, D.H., Lickley, H.L. & Vranic, M. Interactions between glucagon and other counterregulatory hormones during normoglycemic and hypoglycemic exercise in dogs. *J. Clin. Invest.*, 1984, 74, 1404-1413.
- Wasserman, D.H., Spalding, J.A., Bracy, D., Lacy, D.B., & Cherrington, A.D. Exercise-induced rise in glucagon and ketogenesis during prolonged muscular work. *Diabetes*, 1989, 38, 799-807.
- Wasserman, D.H., Spalding, J.A., Lacy, D.B., Colburn, C.A., Goldstein, R.E., & Cherrington, A.D. Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am. J. Physiol.*, 1989, 257, E108-E117.

## **ANNEXE**

# American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism

A Publication of the American Physiological Society

Jeffrey E. Pessin, Editor  
ASSOCIATE EDITORS:  
Robert S. Bar  
Jerry Radziuk  
Robert A. Rizza  
Deborah L. Segaloff  
Curt D. Sigmund

October 5, 2000

Dr. Carole Lavoie  
Departement des sciences de l'activite physique  
Universite du Quebec a Trois-Rivieres  
Case Postale 500  
Trois-Rivieres  
Quebec G9A 5H7  
Canada

Dear Dr. Lavoie:

I am pleased to inform you that your revised manuscript (Ref. #E-313-0R) entitled "Increased Density of Glucagon Receptors in Liver from Endurance Trained Rats" has been accepted for publication. The revised manuscript and the disk are being forwarded to Bethesda, where the manuscript will be copyedited, sent to the printer for typesetting, and published in the next available issue. Please return your page proofs promptly when you receive them and limit your changes to minor editorial or typesetting corrections. We expect you to order any reprints you need at that time and accept the responsibility for paying the page charges that help offset the high cost of publication.

Please note that if you have made any changes in authorship of your manuscript (additions, deletions, change in order), you must immediately contact the Bethesda office to obtain a new Copyright Form and an Authorship Changes form, both of which must be signed by ALL authors. A journal contact sheet for the Publications Department is enclosed for your convenience, so that you can reach appropriate staff at any time during the publication process.

The abstract from your disk will be posted in the Society's electronic journal *APSTRACTS*, unless you specified on the Copyright Transfer Form that you do not want the abstract posted, or the disk you supply cannot be converted. Submission and acceptance dates are included in the posting. Thank you for allowing the *Journal* to publish this manuscript.

Sincerely,

Jeffrey E. Pessin  
Editor

AJP: Endocrinology & Metabolism Editorial  
Department of  
University of Iowa College of  
6-471 BSB  
Iowa City, IA 52242-

Phone: 319/353-  
FAX: 319/353-  
Internet: [ajp@uiowa.edu](mailto:ajp@uiowa.edu)